



# Transport des acides aminés et virulence nutritionnelle de *Francisella tularensis*

Gaël Gesbert

## ► To cite this version:

Gaël Gesbert. Transport des acides aminés et virulence nutritionnelle de *Francisella tularensis*. Microbiologie et Parasitologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T023 . tel-01071293

**HAL Id: tel-01071293**

**<https://theses.hal.science/tel-01071293>**

Submitted on 3 Oct 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes – Faculté de Médecine

Thèse de Doctorat en sciences présentée par

**Gaël Gesbert**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Gc2iD – Spécialité : Infectiologie, Microbiologie

# **Transport des acides aminés et virulence nutritionnelle de *Francisella tularensis***



Soutenue publiquement le 25 septembre 2014, devant le jury composé de :

Dr. Alain Charbit	Inserm, Univ. Paris 5	Directeur de thèse
Pr. Xavier Nassif	Inserm, AP-HP, Univ. Paris 5	Président du jury
Pr. Max Maurin	Inserm, PU-PH, Univ. Grenoble	Rapporteur
Pr. Michel Simonet	Inserm, CHRU Lille, Univ. Lille 2	Rapporteur
Pr. Olivier Dussurget	Institut Pasteur, Univ. Paris 7	Examineur
Dr. Ludovic Tailleux	Institut Pasteur, Paris	Examineur



Université Paris Descartes – Faculté de Médecine

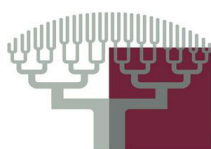
Thèse de Doctorat en sciences présentée par

**Gaël Gesbert**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Gc2iD – Spécialité : Infectiologie, Microbiologie

# **Transport des acides aminés et virulence nutritionnelle de *Francisella tularensis***



PARIS  
DESCARTES



Soutenue publiquement le 25 septembre 2014, devant le jury composé de :

Dr. Alain Charbit	Inserm, Univ. Paris 5	Directeur de thèse
Pr. Xavier Nassif	Inserm, AP-HP, Univ. Paris 5	Président du jury
Pr. Max Maurin	Inserm, PU-PH, Univ. Grenoble	Rapporteur
Pr. Michel Simonet	Inserm, CHRU Lille, Univ. Lille 2	Rapporteur
Pr. Olivier Dussurget	Institut Pasteur, Univ. Paris 7	Examineur
Dr. Ludovic Tailleux	Institut Pasteur, Paris	Examineur



Unité de pathogénie des infections systémiques, Inserm 1151 équipe 11  
Institut Necker Enfant Malade, Université Paris Descartes  
Bâtiment Leriche – Porte 9  
14 rue Maria Helena Viera Da Silva  
75014 Paris

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi. »*

**Albert Einstein**

*« Si l'objectif n'est pas précis, la connerie, elle, le sera. »*

**Professeur Matula**

## Remerciements

Comment ne pas commencer par un merci ?

Un immense Merci à Alain Charbit et à Karin Meibom non seulement de m'avoir accueilli dans l'équipe Francisella mais aussi de m'avoir guidé et aiguillé durant ces trois années de thèse.

Un grand merci à Xavier Nassif de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de prendre la direction de mon jury de thèse.

Merci à Max Maurin et à Michel Simonet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Merci à Olivier Dussurget et à Ludovic Tailleux d'avoir examiné mes travaux.

Merci à toute l'unité 1151, présente et passée, pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur :

Monique Barel pour sa gentillesse, Elodie Ramond pour ces trois ans en commun, Emmanuelle Bille pour son humour, Matthieu Coureuil pour ses débats, Olivier Join-Lambert pour son décalage, Hervé Lecuyer pour son journal à table, Jean Bergounioux pour sa simplicité, Anne Jamet au nom de la musique, Marion Dupuis pour ses conseils, Daniel Euphrasie pour son humour noir, Eric Frapy pour apple, Julie Meyer pour sa motivation, Fabiola Tros pour ces idées, Hélène Capel Malo pour son accent, Florence Miller pour ses histoires, Jennifer Diepedale pour ses conseils, Guillaume Postic pour les fraises de Plougastel et Terry Brissac pour un peu de tout.

Mes remerciements vont tout particulièrement à ma grande Famille. A mon Papa, pour l'exemple qu'il m'a toujours donné, à ma Maman car il n'en existe pas deux comme elle, à mes frères, Fabien pour son ingéniosité et Cédric qui m'étonnera toujours. Sans vous rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir aidé à chaque étape de ma vie. Mes remerciements vont aussi à mes grands-parents, oncles, tantes, cousins, cousines de Bretagne qui en plus de me faire découvrir le foot, la musique et mille autres choses m'ont donné le goût du savoir. Sans oublier mes deux filleules, Claire-Maire et Sarah, qui m'impressionnent toujours.

Je me dois aussi de remercier tout ceux qui m'ont soutenu durant toutes mes études et avec qui j'ai pu réaliser de nombreux projets, souvent farfelus. Florent, on a bien grandi depuis le ski ; Pilou, il va falloir que tu retournes au Chili pour ce que tu m'avais promis. Cass, Guim, Guen, Elisabeth et Pascal pour la formidable famille Frey. Guy-Alain, Bruno, Sébastien, Christian, Sylviane, Olivier et Nada pour la non moins formidable famille Nicol. Les Cadot, car ils vivent ce qu'il pensent. Benoit pour m'avoir ouvert au monde de la guitare et m'avoir fait confiance. Les Padres Bruno, Thierry, JBR, François, Marco, Olivier et Marc pour leurs réponses à mes questions et pour m'avoir fait grandir. Merci à toutes les équipes des aventures BAFA, Sydney 2008, Madrid 2010, Rio 2013, Frats anim et Sweat Blanc, Camps ski, Scouts et Guides de France, Générations Solidaires pour Elancourt, toutes celles que j'oublie et toutes les futures. Vous m'avez montré qu'ensemble rien n'est impossible. À tous les jeunes, enfants ou ados, qu'il m'a été donné de rencontrer durant ma vie d'animateur, et que j'ai vu grandir. Vous m'avez fait découvrir qu'il y a plus de bonheur à donner qu'à recevoir. Tous ceux qui, à force de taper dans la balle, sont devenus des amis, JB, Arnaud, Alexandre, Clément, Matthieu... Tous ceux avec qui j'ai refait le monde durant cent soirées. Toute l'équipe QTS1 avec qui j'ai tant appris durant ces 5 années, Madelyne, Hélène, Pascal, Marielle, la famille Aguessy, Monique,... Tous ceux que la PEM m'a amené à rencontrer. Merci à ceux qui ont fait changer mon regard sur les choses. Merci aux grand Chef pour tout ce qu'il m'a permis de vivre et pour son accompagnement. Tous ceux que j'oublie très certainement.

Merci aux professeurs qui m'ont beaucoup appris et qui ont cru en moi : Mme Brossard, Mme Barrat, Mme Odelin, M. Thévenet...

La meilleure pour la fin : Un immense merci à Colombine pour son soutien indéfectible durant ces années de thèses. Le meilleur est à venir !

## **Abréviations :**

aa : Acide aminé

BMM : Bone marrow derived macrophages

CFU : unité formant colonie

FCP : *Francisella* containing phagosome

FCV : *Francisella* containing vacuole

FPI : *Francisella* pathogenicity island

*F. holarctica* : *Francisella tularensis* sous-espèce *holarctica*

*F. novicida* : *Francisella tularensis* sous-espèce *novicida*

*F. tularensis* : *Francisella tularensis* sous-espèce *tularensis*

kDa : Kilodalton

LPS : Lipopolysaccharide

LVS : Live vaccine strain

LAMP-1 : Lysosomal-associated membrane protein

MSF : Major facilitator superfamily

NO : Nitric oxyde

nt : Nucléotides

ORF : Open reading frame

pb : Paires de bases

ppGpp : Guanosine tétraphosphate

RD : regional difference

RNS : reactive nitrogen species

ROS : reactive oxygen species

subsp. : sous-espèce

SST : système de sécrétion de type

## Résumé :

*Francisella tularensis*, agent étiologique de la tularémie, est un pathogène intracellulaire facultatif capable d'infecter de nombreuses cellules de mammifères. Pour se multiplier activement dans le cytoplasme des cellules hôtes, la bactérie doit être en mesure de capter dans cet environnement tous les composés nécessaires à son métabolisme, et notamment des acides aminés qui représentent ses principales sources de carbone et d'azote. Les pathogènes à multiplication intracellulaire ont mis en place un ensemble de mécanismes, visant i) la manipulation des voies métaboliques de l'hôte, pour accroître le pool de nutriments disponibles, et ii) l'expression de transporteurs dédiés, pour la captation optimale de ces nutriments. Cet ensemble de mécanismes est regroupé sous le terme de « virulence nutritionnelle ». Chez *Legionella pneumophila*, plusieurs membres d'une sous-famille de transporteurs actifs secondaires (désignés Pht, ou transporteurs phagosomaux), responsables de la captation des acides aminés lors de la phase intracellulaire de la bactérie, ont été caractérisés.

Dans ce travail, nous avons établi le rôle de deux membres de la sous-famille des transporteurs Pht (désignés AnsP et IleP), dans le transport d'acides aminés et la virulence de *Francisella*. La protéine AnsP est un transporteur d'asparagine. La délétion du gène codant pour ce transporteur n'a pas d'effet sur la croissance de *Francisella* en milieu synthétique, mais entraîne une diminution drastique de sa multiplication intracellulaire dans tous les types cellulaires testés, ainsi qu'une atténuation importante de la virulence chez la souris. La perte de virulence du mutant *asnP* est réversible aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* par ajout d'asparagine en excès. *F. tularensis*, qui est prototrophe pour l'asparagine en milieu minimum, devient donc auxotrophe dans le cadre de sa croissance intracellulaire, et nécessite un transport de cet acide aminé via AnsP. Ce changement de besoins en asparagine entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire illustre bien le phénomène d'adaptation nutritionnel que réalise la bactérie dans le cadre d'une infection.

La délétion du second transporteur, IleP, entraîne un défaut de croissance en milieu minimum, réversible par ajout de thréonine, un précurseur métabolique de l'isoleucine chez *F. tularensis* subsp. *novicida*. Des expériences d'incorporation d'isoleucine marquée ont permis de mettre en évidence la fonction de transporteur d'isoleucine de la protéine IleP. La délétion du gène codant pour IleP entraîne également un défaut de multiplication *in vitro*, associé à un léger retard de sortie du phagosome ainsi qu'une atténuation importante de la virulence chez la souris. Ce transporteur assure donc la captation de l'isoleucine dans des conditions où l'utilisation de la thréonine, ne permet pas d'assouvir les besoins de la bactérie. De façon remarquable, la voie de biosynthèse de l'isoleucine *via* la thréonine est interrompue chez les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*. La croissance de ces sous espèces, plus virulentes que *novicida*, dans la cellule infectée devient donc strictement dépendante du transport de l'isoleucine par IleP. Cet exemple constitue une parfaite illustration de la spécialisation des souches pathogènes aux conditions nutritionnelles de leur hôte.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a permis de démontrer la participation de deux transporteurs d'acides aminés à la virulence nutritionnelle de la bactérie *Francisella*.

## **Table des matières**

<b>Introduction .....</b>	<b>5</b>
 <b>Chapitre I : <i>Francisella tularensis</i>, une bactérie d'intérêt majeur .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Le genre <i>Francisella</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Taxonomie.....</b>	<b>7</b>
1.1.1 <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> et subsp. <i>holarctica</i> .....	7
1.1.2 <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> .....	9
1.1.3 <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>philomiragia</i> .....	9
1.1.4 Nouvelles espèces et sous-espèces de <i>Francisella</i> .....	10
<b>1.2 Caractères bactériologiques .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Caractères génotypiques .....</b>	<b>15</b>
<b>2. La tularémie .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Epidémiologie.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Répartition géographique.....	17
2.1.2 Réservoirs naturels.....	19
2.1.3 Surveillance de la tularémie humaine .....	21
<b>2.2 Modes de contamination, manifestations cliniques, diagnostics et traitements de la tularémie .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Modes de contamination .....	28
2.2.2 Manifestations cliniques .....	30
2.2.3 Diagnostics de la tularémie .....	34
2.2.4 Traitement et prophylaxie .....	37
<b>3. <i>Francisella</i> et la guerre biologique.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Classification des armes biologiques .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 <i>F. tularensis</i>, un agent de bioterrorisme de première catégorie .....</b>	<b>43</b>

## **Chapitre II : Relations hôtes pathogènes lors de l'infection par *Francisella tularensis* ..... 45**

### **1. Réaction de l'hôte face à l'infection intracellulaire : immunité innée et cas du macrophage..... 47**

#### **1.1. L'immunité innée ..... 47**

#### **1.2. Le cas du macrophage..... 48**

##### 1.2.1 Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) ..... 49

##### 1.2.2 Les intermédiaires réactifs de l'azote (RNI) ..... 50

##### 1.2.3 Les peptides antimicrobiens ..... 50

##### 1.2.4 L'autophagie ..... 51

##### 1.2.5 L'apoptose et la pyroptose ..... 52

##### 1.2.6 L'intoxication métallique ..... 54

##### 1.2.7 La restriction en nutriments ..... 55

### **2. La vie intramacrophagique de *Francisella tularensis*..... 56**

#### **2.1. Adhésion et internalisation ..... 56**

#### **2.2. Contrôle du phagosome par *Francisella tularensis* ..... 58**

##### 2.2.1 Maturation du phagosome ..... 58

##### 2.2.2 Acidification phagosomale ..... 59

##### 2.2.3 Inhibition du « burst oxydatif » ..... 60

#### **2.3. Destin intracellulaire de *Francisella tularensis* ..... 62**

##### 2.3.1 Sortie du phagosome et multiplication intracytosolique ..... 62

##### 2.3.2 Adaptations métaboliques et nutritionnelles lors de la phase cytosolique ..... 63

##### 2.3.3 Déclenchement de la mort cellulaire de l'hôte et sortie de la cellule ..... 64

### **3. Bases moléculaires de la virulence de *Francisella tularensis*..... 65**

#### **3.1. Le Génome ..... 66**

#### **3.2. Le lipopolysaccharide..... 68**

#### **3.3. La capsule..... 69**

#### **3.4. Acquisition du fer ..... 71**

#### **3.5. L'îlot de pathogénicité de *Francisella* ..... 72**

##### 3.5.1 Découverte et constitution ..... 72

##### 3.5.2 Un système de sécrétion de type VI ? ..... 76

##### 3.5.3 Régulation du FPI ..... 77

##### a. MglA et SspA ..... 77

##### b. FevR et ppGpp ..... 78



c. PmrA .....	78
d. MigR .....	79
e. Hfq .....	79
<b>3.6. Les systèmes de sécrétion .....</b>	<b>80</b>
3.6.1 Le système de sécrétion de type I .....	81
3.6.2 Système de sécrétion de type II et Pili de type IV .....	81
 <b>Chapitre III : Nutrition et virulence .....</b>	<b>83</b>
 <b>1. Virulence et immunité nutritionnelle .....</b>	<b>84</b>
 <b>1.1 L'acquisition de nouvelles voies métaboliques : le premiers pas vers la colonisation .....</b>	<b>85</b>
1.1.1 Utilisation du tétrathionate par <i>Salmonella typhimurium</i> .....	86
1.1.2 Utilisation de l'acide sialique par <i>Vibrio cholerae</i> .....	87
1.1.3 <i>Helicobacter pylori</i> , activité uréase et transport du nickel .....	88
 <b>1.2 Adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte.....</b>	<b>89</b>
1.2.1 La subversion de la voie de dégradation des protéines .....	89
a. <i>Legionella</i> et la dégradation protéosomale.....	90
b. <i>Anaplasma</i> et l'autophagie .....	91
1.2.2 La réduction du génome : un mécanisme d'adaptation des pathogènes .....	92
1.2.3 La synchronisation des auxotrophies hôte/pathogène : un rhéostat de la multiplication intracellulaire .....	94
 <b>2. Nutrition et virulence chez <i>Francisella tularensis</i> .....</b>	<b>95</b>
 <b>2.1 Métabolisme et virulence de <i>Francisella tularensis</i> .....</b>	<b>96</b>
2.1.1 Voies prédites et milieu minimum .....	96
2.1.2 Métabolisme du carbone et virulence .....	98
2.1.3 Voies de biosynthèse des acides aminés aromatiques et virulence.....	101
2.1.4 Voies de biosynthèse des purines, pyrimidines et virulence.....	104
2.1.5 Manipulation des nutriments cytosoliques de l'hôte par <i>F. tularensis</i> .....	106
a. Régulation du transport cellulaire d'acides aminés par <i>F. tularensis</i> .....	106
b. Manipulation de l'autophagie par <i>F. tularensis</i> .....	107
 <b>2.2 Systèmes de transport et virulence chez <i>Francisella tularensis</i> .....</b>	<b>108</b>
2.2.1 Systèmes de transport de <i>Francisella</i> et virulence .....	108
a. Transporteurs actifs primaires de <i>F. tularensis</i> et virulence .....	110
b. Transporteurs actifs secondaires de <i>F. tularensis</i> et virulence .....	110
c. Transporteurs d'ions et autres transporteurs de <i>F. tularensis</i> .....	113
2.2.2 Transporteurs d'acides aminés et la virulence .....	113

a. Transporteurs d'acides aminés et virulence.....	114
b. Les transporteurs phagosomaux d'acides aminés .....	115
<b>Objectifs :.....</b>	<b>120</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>122</b>
<i>L'asparagine : Un acide aminé requis pour la virulence et la dissémination de F. tularensis</i> .....	<b>123</b>
<i>Transport des acides aminés branchés et virulence de Francisella tularensis</i> .....	<b>124</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>126</b>
<b>Annexes : .....</b>	<b>132</b>
<i>Annexe 1 : Proteins involved in Francisella tularensis survival and replication inside macrophages. ....</i>	<b>133</b>
<i>Annexe 2 : Glutamate utilization couples oxidative stress defense and the tricarboxylic acid cycle in Francisella phagosomal escape.....</i>	<b>134</b>
<i>Annexe 3 : Possible links between stress defense and the tricarboxylic acid (TCA) cycle in Francisella pathogenesis. ....</i>	<b>135</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>136</b>

## Introduction

La tularémie, aussi appelée maladie de Francis, maladie de Ohara, fièvre de la mouche du cerf, Yato-Byo ou fièvre de la vallée de Pahvant est une arthropozoonose cosmopolite endémoépidémique, dont les réservoirs animaux sont nombreux (lièvre, lapin, renard, rat, écureuil, sanglier,...). Cette maladie, principalement animale, atteint accidentellement l'Homme chez qui elle peut être mortelle en absence de traitement. Elle sévit dans différentes régions du monde et plus particulièrement dans l'hémisphère nord.

L'agent responsable de la tularémie, *Francisella tularensis*, a été isolé en 1911 à partir de cadavres d'écureuils dans le comté de Tulare (Californie), qui lui a donné son nom. Cette maladie et son agent ont été étudiés jusqu'en 1924 par Mac Coy, Chapin, Lamb, Francis, Parker et Spencer. Leurs travaux ont montré que : i) l'affection sévissant chez les écureuils et les lapins sous la dénomination de « pseudopeste des rongeurs » était la même touchant l'Homme sous des dénominations diverses ; ii) son agent était identique et iii) des vecteurs pouvaient jouer un rôle dans la transmission de la maladie. C'est pour ces raisons qu'en 1974, cette bactérie, jusque-là appelée *Bacterium tularensis*, fut rebaptisée *Francisella tularensis*, en l'honneur de son découvreur Edward Francis. En 1920, Ohara met en évidence la présence de la tularémie au Japon, où elle aurait été décrite par Homma dès 1820. Par la suite, la maladie a été décrite dans de nombreux pays du continent eurasiatique.

En France, plusieurs cas suspects ont été décrits dès 1930, puis diagnostiqués en 1946-1947 dans quatre départements français : La Touraine, la Franche-Comté, la Côte-d'Or et la Gironde. Depuis, cette affection est régulièrement mise en évidence, aussi bien chez l'animal que chez l'Homme, le plus souvent sous la forme de cas sporadiques.

Classée depuis de nombreuses années en tant qu'arme biologique de première catégorie, *F. tularensis* connaît, depuis 2001, un regain d'intérêt. En effet, son caractère hautement pathogène, notamment par voie pulmonaire, en fait une arme bioterrorisme de premier choix.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous rappellerons tout d'abord les principales caractéristiques du genre *Francisella*, la pathologie que cette bactérie provoque chez l'homme, ainsi que son utilisation potentielle dans la guerre biologique. Le second chapitre nous amènera à discuter des relations hôtes-pathogènes lors de l'infection par *F. tularensis*. Enfin, dans le dernier chapitre, nous aborderons les liens entre la nutrition et la virulence chez les bactéries pathogènes, et en particulier chez les bactéries à multiplication intracellulaire.

## **Chapitre I : *Francisella tularensis*, une bactérie d'intérêt majeur**

Ce premier chapitre sera consacré à une présentation générale de la bactérie *Francisella tularensis*. Dans un premiers temps, je m'intéresserai à la bactérie elle-même dans ces aspects phylogéniques, bactériologiques et génotypiques. Dans un second temps, je traiterai de la tularémie, maladie provoquée par *F. tularensis*. Dans un dernier temps, je développerai les aspects guerre biologique et bioterrorisme liés à *F. tularensis*.

## 1. Le genre *Francisella*

### 1.1 Taxonomie

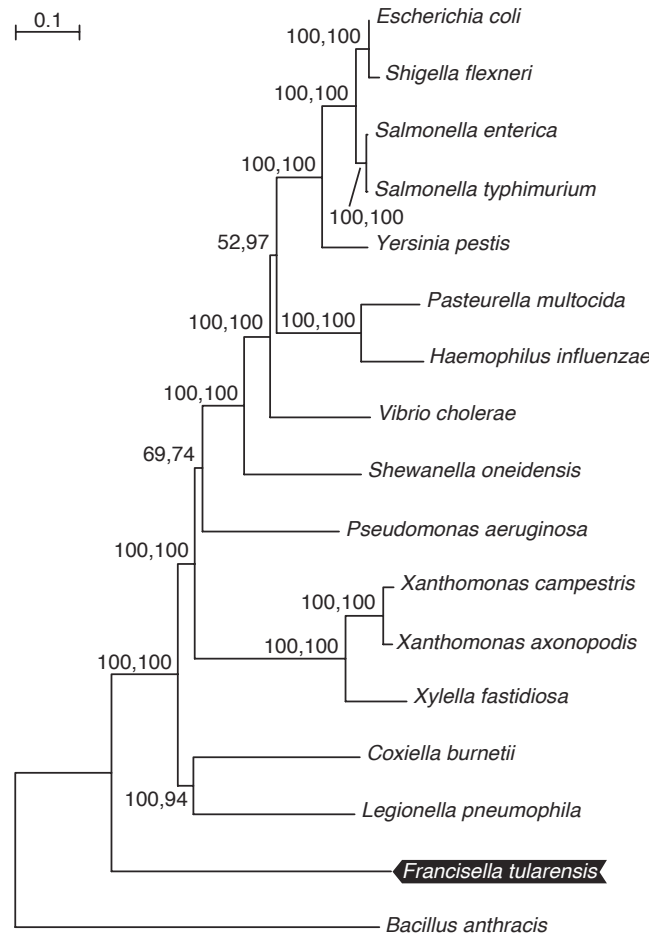
#### 1.1.1 *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* et subsp. *holarctica*

La position taxonomique de *F. tularensis* a connu de nombreuses modifications depuis sa découverte (voir tableau 1). *F. tularensis*, d'abord nommée *Bacillus tularensis* par Edward Francis, a été, suite à des études sérologiques, classée dans le genre *Pasteurella*. Ce n'est qu'en 1947 que Dorofé'ev propose de former le genre *Francisella*, avec comme seule et unique espèce *F. tularensis* (Dorofé'ev).

Par la suite, des expériences d'hybridation ADN-ADN ont confirmé que le nouveau genre bactérien *Francisella* n'appartenait pas aux genres *Pasteurella*, *Yersinia* ou aux entérobactéries (Ritter and Gerloff, 1966). En 1994, l'analyse de séquences d'ARN ribosomal 16S n'a révélé aucun lien entre le genre *Francisella* et d'autres genres bactériens décrits (Forsman et al., 1994). De plus, ces études ont permis de classer *Francisella* dans la subdivision des gamma-protéobactéries et dans l'ordre des *Thiotrichales*.

Au sein des gammaproteobacteria, la famille la plus proche des *Francisellaceae* est celle des *Piscirickettsiaceae*, dont fait partie la bactérie *Piscirickettsia salmonis*, agent de septicémies du poisson (Fryer et al., 1992). Les organismes les plus proches de *Francisella* sont des bactéries intracellulaires obligatoires, comme *Wolbachia persica*, et deux autres endosymbiontes de tiques (Sjöstedt, 2005). D'autres organismes intracellulaires, comme *Legionella* et *Coxiella*, sont aussi phylogénétiquement proches de *F. tularensis* (voir figure 1).

**Figure 1 :** Relations phylogénétiques de 16 espèces de gamma-protéobactéries, dont *Francisella tularensis*, par un alignement de protéines encodées par les gènes *dnaA*, *ftsA*, *mfd*, *mraY*, *murB*, *murC*, *parC*, *recA*, *recG* et *rpoC*. D'après (Larsson et al., 2005)



En 1959, deux agents étiologiques de la tularémie sont mis en évidence chez le lièvre comme ayant une virulence différente (Olsufjev NG et al., 1959). De ces observations découlent deux sous-espèces de *F. tularensis*. La première, regroupant des isolats particulièrement pathogènes retrouvés uniquement en Amérique du Nord, est appelée « Biovar *tularensis* » ou « type A » et puis *F. tularensis* subsp. *tularensis*. La seconde, retrouvée dans tout l'hémisphère nord et présentant une virulence moins importante est appelée « Biovar *palaeartica* » ou « type B » puis *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Olsufjev NG., 1970). Par la suite, une troisième sous-espèce, *F. tularensis* subsp. *mediasitica*, a été créée à partir d'isolats d'Asie Centrale et de Russie.

### 1.1.2 *Francisella tularensis* subsp. *novicida*

Isolée pour la première fois en 1951 dans un échantillon d'eau aux Etats-Unis, *F. tularensis* subsp. *novicida* a tout d'abord été rattachée au genre *Pasteurella* (Larson et al., 1955), puis transférée dans le genre *Francisella* en 1959 sous le nom *F. novicida* (Olsufiev NG et al., 1959).

Jusqu'en 1989, cette souche restera la seule représentante l'espèce. En 1989, Hollis rapporte l'isolement de deux souches de *F. novicida* à partir de prélèvements d'origine humaine : une souche isolée des ganglions lymphatiques d'un patient présentant une infection comparable à la tularémie ulcéro-ganglionnaire et une souche isolée du sang d'un individu âgé et alcoolique, présentant une infection comparable à la forme typhoïde de la tularémie (Euseby JP). Au vu des caractères biochimiques et d'expérience d'hybridation ADN-ADN, il est proposé de reclasser la bactérie comme une sous-espèce de *Francisella tularensis* (Hollis et al., 1989). Cette proposition a été confirmée en 1994 par une analyse de l'ARN 16S ribosomal de *F. novicida* qui s'est avérée identique à celui de *F. tularensis* (Forsman et al., 1994). Il est donc communément admis l'actuelle taxonomie basée sur la phylogénie : *F. tularensis* subsp. *novicida* (voir tableau 1). Cependant, les différences de cycle de vie, de virulence et de pouvoir pathogène chez l'Homme entre *F. tularensis* subsp. *novicida* et les sous espèces *tularensis* et *holarctica* demeurent des points de discussion de ce classement.

### 1.1.3 *Francisella tularensis* subsp. *philomiragia*

Une troisième espèce, appelée *F. philomiragia*, a été isolée d'un rat musqué dans l'Etat de l'Utah en 1959 (Jensen et al., 1969). L'année suivante, quatre isolats d'échantillons d'eau ont été étudiés et classés dans le genre *Yersinia* pour leur parenté d'ADN avec *Y. pestis* (25%) (Ritter and Gerloff, 1966), ainsi que leur ressemblance morphologique dans les tissus d'animaux infectés (Bercovier, H. and H. H. Mollaret, 1984). Ce n'est qu'en 1989, après des analyses d'hybridation ADN-ADN et l'étude de la composition en acide gras de la paroi bactérienne de *Y. philomiragia*, qu'Hollis et ses collaborateurs ont proposé un transfert taxonomique vers le genre *Francisella* (Hollis et al., 1989) (voir tableau1).

#### 1.1.4 Nouvelles espèces et sous-espèces de *Francisella*

En 2007, une bactérie responsable d'infections graves chez les cabillauds d'un élevage norvégien est décrite comme appartenant au genre *Francisella*. Elle est nommée *F. piscicida* (Caipang et al., 2010; Ottem, K. F, 2007).

En 2010, l'analyse de la souche FhSp1T isolée de sang humain par séquençage de l'ARN16S et du gène *recA* a permis de mettre en évidence une nouvelle espèce de *Francisella* appelée *F. hispaniensis* (Huber et al., 2010).

En 2011, l'analyse d'une souche de *Francisella* pathogène d'ormeaux géants du Japon a permis d'identifier *F. haliotica*, une nouvelle espèce de *Francisella* (Brevik et al., 2011).

Une autre espèce de *Francisella* a été décrite en 2009 : *F. noatunensis*. Cette espèce, mise en évidence par l'Institut National Vétérinaire de Norvège lors d'examen de morues d'élevage présentant une maladie granulomateuse, constitue la quatrième espèce de genre *Francisella*. Dans un premier temps classée comme une sous-espèce de *F. philomiragia*, *F. noatunensis* n'a été élevée au rang d'espèce qu'en 2009, suite à l'étude des séquences ARN 16S et de neuf gènes domestiques (Ottem et al., 2009).

Pour terminer, une nouvelle espèce de *Francisella*, *F. guangzhouensis*, a été identifiée en 2013 dans l'eau de systèmes d'air conditionné d'un immeuble de la ville de Guanzhou, en Chine (Qu et al., 2013).



**Tableau 1 :** Classification phylogénique de *Francisella tularensis*

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Thiotrichales
Famille	<i>Francisellaceae</i>
Genre	<i>Francisella</i>
Espèces	<i>tularensis</i>
	<i>philomiragia</i>
	<i>piscicida</i>
	<i>noatunensis</i>
	<i>hispaniensis</i>
	<i>haliotida</i>
	<i>guangzhouensis</i>
Sous-espèces de <i>F. tularensis</i>	<i>tularensis</i> (type A)
	<i>holarctica</i> (Type B)
	<i>novicida</i>
	<i>mediasitica</i>

## 1.2 Caractères bactériologiques

La famille des *Francisellaceae* est constituée de coccobacilles à Gram négatif, d'une longueur variant entre 0,2 et 1,7  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre compris entre 0,2 et 0,7  $\mu\text{m}$ . Dans les tissus infectés, la morphologie est polymorphe. On y retrouve des bactéries allongées, pouvant donner des filaments, ainsi que d'autres formes, dites « minutes », d'une taille d'environ 300 nm. Les *Francisellaceae* sont immobiles, aérobies strictes, catalase faiblement positive, oxydase négative, uréase négative, indole négative, nitrate réductase négative et dégradent les sucres en générant peu d'acide et sans production de gaz.

Les formes virulentes de *F. tularensis* sont entourées d'une capsule polysaccharidique de 0,02 à 0,04  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, dont la perte n'affecte pas la viabilité, mais s'accompagne d'une perte de virulence. Le pourcentage en lipide de la paroi (70%) est assez inhabituel pour une bactérie à Gram négatif et la nature des acides gras est caractéristique du genre *Francisella*.

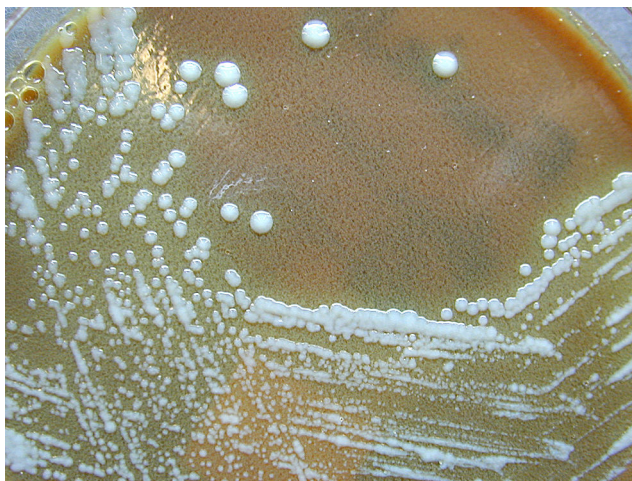
Elle est constituée d'acides gras à longues chaînes carbonées ( $C_{18}$  à  $C_{26}$ ) saturées ou mono-insaturées et de deux types d'acides gras hydroxylés ( $C_{16}:0\ 3OH$  et  $C_{18}:0\ 3OH$ ).

La culture des *Francisellaceae* est fastidieuse, en particulier pour les sous-espèces *tularensis*, *holarctica* et *mediasitica*, pour qui elle est plus difficile que pour la *F. novicida* et *F. philomiragia*. En effet, l'étude du génome de *F. tularensis* subsp. *tularensis* montre que plus de 10% de ces gènes contiennent des insertions ou présentent des délétions ou des substitutions. Cette proportion de gènes rendus inactifs entraîne l'absence de certaines voies métaboliques qui expliquent les nombreuses exigences de la bactérie pour sa croissance.

Les principaux milieux utilisés pour l'isolement et la culture de *F. tularensis* sont le milieu de Francis, le milieu de Mc Coy et Chapin, le milieu glucose-cystéine-peptone, la gélose BCYE ou la gélose chocolat enrichie en IsoVitaleX<sup>TM</sup> (Beckon Dickinson, France) ou PolyViteX<sup>TM</sup> (AES, France). Les mélanges nutritifs IsoVitaleX<sup>TM</sup> et PolyViteX<sup>TM</sup>, initialement conçus pour la croissance des espèces *Haemophilus* et *Neisseria*, fournissent des vitamines, des acides aminés, des coenzymes, du dextrose, des ions ferriques, le facteur V (nicotinamide-adénine-dinucléotide, NAD) ainsi que d'autres facteurs favorisant la croissance des souches exigeantes.

Sur ces milieux, après incubation à 37°C, la culture apparaît en 2 à 4 jours. La croissance bactérienne est facilitée en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>). Les colonies sont convexes, opaques, lisses, brillantes et de couleur crème. Leur taille varie de 1 à 3 mm (voir figure 2). D'une manière générale, *F. novicida* pousse plus rapidement et donne une culture plus abondante que *F. tularensis*.

**Figure 2 :** Aspect des colonies de *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* souche LVS sur gélose chocolat enrichie en IsoVitaleX<sup>TM</sup> après 48h de culture à 37°C



Les différentes espèces de *Francisella* ne sont capables de dégrader qu'un nombre limité de sucres sans production de gaz. Seule la sous-espèce *mediasitica* ne peut pas fermenter le glucose et le maltose, cela en fait donc un caractère discriminant (voir tableau 2). Les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* peuvent être distinguées par leur utilisation du glycérol et la présence d'une citruline uréidase (Marchette and Nicholes, 1961). *F. philomiragia* est la seule espèce possédant une oxydase et une gélatinase. La production d'indole est caractéristique des espèces *philomiragia* et *piscida*. Pour terminer, seules les espèces *philomiragia* et *piscida* ainsi que la sous-espèce *novicida* peuvent assimiler le saccharose (voir tableau 2).

**Tableau 2 :** Caractères phénotypiques de différenciation entre les espèces et sous-espèces appartenant au genre *Francisella*. D'après (Karl F. Ottem et al., 2007; Ottem, K. F, 2007; Sjöstedt, A. B., 2005)

	<i>F. t</i> subsp <i>tularensis</i>	<i>F. t.</i> subsp <i>holarctica</i>	<i>F. t.</i> subsp <i>mediasitica</i>	<i>F. t</i> subsp <i>novicida</i>	<i>F.</i> <i>philomiragia</i>	<i>F.</i> <i>piscida</i>
Taille	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm	<0,5 µm
Mobilité	-	-	-	-	-	-
Capsule	+	+	+	-	ND	ND
Température optimale de croissance (°C)	37	37	37	37	25 ou 37	20
Croissance sur Mac Conkey	-	-	-	R	R	R
Croissance sur gélose au sang	-	-	-	+	+	-
Besoin en cystéine	+	+	+	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	+	+
Uréase	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	-	-	-	-	+	-
Production d'H <sub>2</sub> S sur milieu supplémenté en cystéine	+	+	+	+	+	Faible
B-lactamase	+	+	-	+	+	+
Fermentation des sucres :						
Maltose	+	+	-	R	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	+	+	+
D-Glucose	+	+	-	+	R	+
Glycérol	+	-	+	R	-	-
Citrulineureidase	+	-	+	+	ND	ND

### 1.3 Caractères génotypiques

Le séquençage des génomes de souches de *Francisella* est relativement récent. En effet, le séquençage total du génome de la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 a été réalisé en 2005 (Larsson et al., 2005). Par la suite, le séquençage du génome de nombreuses souches de *Francisella* a été réalisé et de nouveaux génomes sont en cours d'analyse. Actuellement, les génomes complets de plus de 20 souches de *F. tularensis* sont consultables en ligne.

La taille des génomes des différentes sous-espèces de *F. tularensis* varie entre  $1,5.10^6$  et  $2,0.10^6$  paires de bases (pb) et le pourcentage en G+C entre 33 et 36% (Sjöstedt, A. B., 2005). Ce faible pourcentage en G+C est une des caractéristiques du genre *Francisella*. L'étude des génomes séquencés s'est révélée d'une importance primordiale dans la compréhension des liens phylogénétiques entre les différentes sous-espèces. Elle a de plus permis l'identification de gènes prédits comme impliqués dans la virulence, le métabolisme ou le transport.

*F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, dont la séquence génomique totale a été analysée la première, provient d'un cas clinique humain de tularémie identifié dans l'état de l'Ohio aux Etats-Unis (Larsson et al., 2005). Cette séquence de 1.892.919 pb (1,89 Mpb) contient 1.804 régions codantes, dont 302 spécifiques au genre *Francisella*. L'étude de ce génome a permis de mettre en évidence des mutations, par insertion ou délétion, dans plus de 10% des gènes, les rendant ainsi inactifs. Ces gènes correspondent majoritairement à des protéines impliquées dans le transport, le métabolisme de l'ADN et la synthèse d'acides aminés. En conséquence, plus de la moitié des voies métaboliques de la souche Schu S4 sont interrompues, expliquant ainsi en partie les exigences nutritionnelles et l'importance du transport pour la survie de la bactérie.

Dans un second temps, la séquence de la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* OSU18, isolée en 1978 dans l'Etat de l'Oklahoma sur un castor mort de la tularémie, a été analysée. D'une taille de 1.895.727 pb, le génome de cette souche contient 1.924 régions codantes et présente 99% d'identité avec la séquence génomique de la souche SCHU S4 (Petrosino et al., 2006). De même, elle présente une mutation dans environ 10% de ses gènes.

Bien qu'ayant une séquence nucléotidique proche, les génomes des deux sous-espèces *tularensis* et *holarctica* présentent des arrangements différents. En effet, certaines régions répétées ne sont pas disposées à des endroits identiques du génome. Ces régions répétées, constituant des régions appelées séquences d'insertion (IS), favorisent des phénomènes de réarrangement génomique par recombinaison. Ces phénomènes de réarrangement génomique

sont particulièrement retrouvés chez la sous-espèce *tularensis* qui présente un polymorphisme dans ces séquences génomiques (Beckstrom-Sternberg et al., 2007; Chaudhuri et al., 2007). Des variations, dues à des inversions et des translocations de séquences, sont observables chez différents isolats de la sous-espèce *tularensis* originaires de différentes régions des Etats-Unis (Beckstrom-Sternberg et al., 2007).

L'analyse du polymorphisme de ces génomes a conduit à la création de deux sous-populations. La première, appelée A.1, est retrouvée dans le centre-Sud des Etats Unis. La seconde, A.2, est retrouvée dans les zones montagneuses de l'Ouest. On estime que ces deux sous-populations de *F. tularensis* subsp. *tularensis* ont évolué différemment en fonction de leur distribution géographique, de leurs hôtes et de leurs vecteurs, différents d'une localisation à l'autre. De nombreux génotypes, de virulence très variables, sont actuellement décrits pour les souches de type A (A1a, A1b, A2a, A2b) et B (Molins et al., 2010; Pandya et al., 2009). Le génotype A1b, dont fait partie *F. tularensis* subsp *tularensis* Schu S4, est celui contenant les souches les plus virulentes.

Dans un troisième temps, l'analyse de la séquence génomique de la souche *F. tularensis* subsp. *novicida* a mis en lumière une identité de 97,8% avec la souche *F. holarctica* LVS (Live Vaccine Strain) et de 98,1% avec la souche *F. tularensis* SCHU S4 (Rohmer et al., 2007). Il est notable que les génomes des souches SCHU S4 et LVS contiennent davantage de zones dupliquées que le génome de U112. Cependant, le génome de U112 a subi moins de réarrangements chromosomiques et ne possède que 1% de gènes rendus inactifs par mutation. Cela explique la culture plus rapide et le plus petit nombre d'auxotrophies de la souche U112.

Les différentes analyses génomiques ont mis en lumière un niveau de conservation important entre les génomes des différentes espèces de *Francisella* et ce, malgré leurs différences de phénotype, de virulence ou de distribution géographique. Cette conservation semble liée au caractère intracellulaire de ces bactéries (Broekhuijsen et al., 2003). En effet, les génomes des sous-espèces *tularensis* et *holarctica* possèdent beaucoup plus de gènes mutés, entraînant de nombreuses voies métaboliques incomplètes, que la sous-espèce *novicida*, faiblement pathogène pour l'Homme. Chez certaines bactéries pathogènes, telles *Yersinia pestis* (Parkhill et al., 2001), *Bordetella pertussis* (Parkhill et al., 2003), *Burkholderia pseudomallei* (Moore et al., 2004) et *Mycobacterium leprae* (Cole et al., 2001), une corrélation entre la perte d'information génétique (due aux réarrangements chromosomiques) et la présence de séquences d'insertion a déjà été démontrée. Ces phénomènes de recombinaison sont caractéristiques des pathogènes virulents ou émergents lors de processus d'adaptation.

L'interruption de voies métaboliques, bien que rendant ces organismes moins résistants dans le milieu extérieur, les rend nettement plus adaptés à leurs hôtes dans lesquels certaines fonctions métaboliques ne sont pas indispensables.

*F. tularensis* semble donc s'être adaptée en perdant notamment certains gènes impliqués dans son métabolisme tout en dupliquant une partie de ses gènes, permettant notamment l'expression de sa virulence et donc sa survie chez l'hôte.

## 2. La tularémie

### 2.1 Epidémiologie

#### 2.1.1 Répartition géographique

Une des caractéristiques importantes de *F. tularensis* est sa capacité à infecter un large panel d'espèces animales terrestres ou aquatiques, laquelle explique la très large répartition des cas de tularémie sur le globe (voir figure 3).

La tularémie se présente le plus souvent sous la forme de cas sporadiques. Cependant, des foyers épidémiques existent aux USA, en ex-URSS et en Europe du Nord. Elle sévit à l'état endémique en Europe centrale et orientale. Des poussées épidémiques de tularémie se produisent, en cycle de 3 à 4 ans, correspondant aux années où des pics de population de micro-mammifères sont enregistrés (Vaissaire et al., 2005). En France, des pics épidémiques semblent avoir lieu tous les 10 ans.

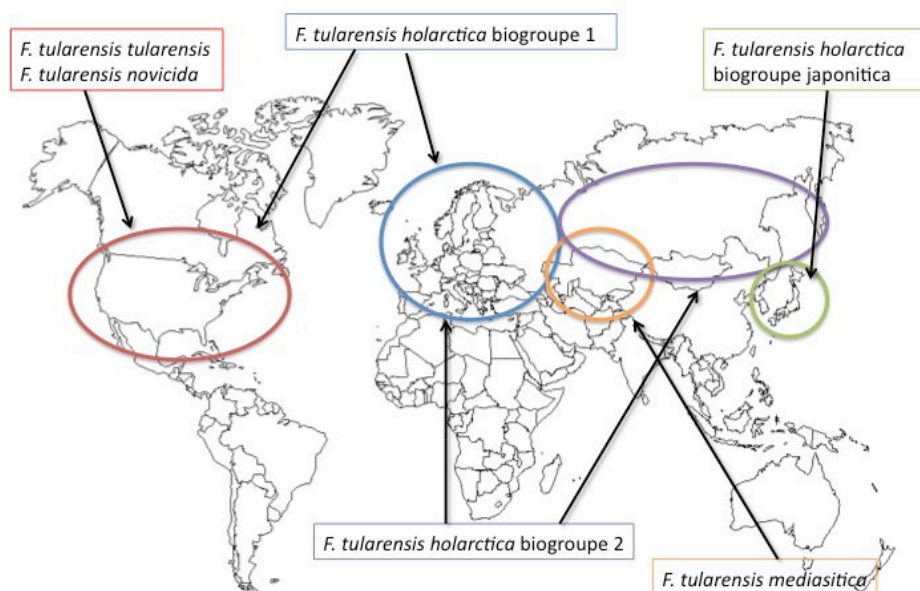
Les cas de tularémie sont principalement localisés dans l'hémisphère nord, entre le 30<sup>ème</sup> et le 71<sup>ème</sup> parallèle. En Amérique du Nord, la souche *F. tularensis* subsp. *tularensis* est la plus retrouvée, principalement aux Etats-Unis, au Canada et au Mexique. La maladie, particulièrement présente dans les régions du centre et du Sud, touche tous les états des Etats-Unis à l'exception d'Hawaï (CDC, 2002). Le nombre de cas décrits varie en fonction de la saison et de la localisation géographique. En effet, à l'Ouest du Mississippi, dans les états du Missouri, de l'Arkansas et de l'Oklahoma, la tularémie sévit l'été. A l'Est du Mississippi, vers les Appalaches et jusqu'aux Grands Lacs, il s'agit d'une tularémie d'hiver (Dr Cavallini). En 2000, la plupart des 142 cas de tularémie mis en évidence aux Etats-Unis ont été décrits dans les états de l'Ouest et du centre/sud : Montana, Dakota du Sud, Arkansas, Kansas et Oklahoma

(Bryant, 2002). Toujours en 2000, des formes de tularémies pulmonaires, dont certaines mortelles, sont survenues à Martha's Vineyard dans le Massachusetts.

En Europe, la sous-espèce la plus retrouvée est *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Sont atteints particulièrement les pays d'Europe centrale traversés par de grands fleuves tels la Lituanie, la Bulgarie, la Roumanie, la Pologne, la Biélorussie et l'Ukraine. L'Europe du Nord est, elle aussi, touchée et plus particulièrement durant l'été. De nombreux cas ont été décrits dans les fjords de Norvège et de Suède, ainsi qu'en Finlande et en République Tchèque (Cerny Z, 2001). En 2002, deux cas de tularémie ont été décrits au Danemark, sur l'île de Nornholm. Cette île est située sur le trajet d'oiseaux migrateurs en provenance de pays endémiques pour la tularémie (Suède et Finlande). Le rôle de ces oiseaux ainsi que des arthropodes les parasitant a été suspecté dans la contamination de l'environnement (Hansson and Ingvarsson, 2002).

L'ex-Union soviétique est-elle touchée par la sous-espèce *F. tularensis* subsp. *mediasitica*, et plus particulièrement dans la région des grands lacs, (Raoult D). En Asie, des cas ont été répertoriés en Afghanistan, en Iran, en Israël, en Birmanie, en Chine, en Corée et au Japon. En Afrique, seule la Tunisie possède des cas répertoriés de tularémie (Dr Cavallini).

**Figure 3 :** Répartition mondiale des sous-espèces de *Francisella tularensis*





### 2.1.2 Réservoirs naturels

*Francisella* possède un éventail de réservoirs naturels extrêmement large et varié. En effet, son cycle naturel fait intervenir non seulement l'environnement mais aussi des animaux et des arthropodes piqueurs.

**Environnement.** La survie de *Francisella* dans l'environnement est très dépendante de la température. En effet, elle peut survivre durant plus de 6 mois à une température de 0°C dans des cadavres d'animaux, de l'eau, de la terre, de la boue, de la paille ou des grains. A l'inverse, à une température de 10°C, sa survie n'est limitée qu'à quelques jours (Euseby JP). L'environnement peut être contaminé par des déjections animales et en particulier de rongeurs. La survie du germe dans l'eau et la boue serait en partie due à une contamination amibienne (Euseby JP). Cette possibilité de survie de la bactérie par infection de protozoaires fait actuellement l'objet de recherches (Titball et al., 2003).

**Animaux.** Plus d'une centaine d'animaux sauvages (Avril JL et al, 2000), 9 espèces d'animaux domestiques, 25 espèces d'oiseaux, des poissons, des amphibiens et des invertébrés ont été décrits comme porteurs de la bactérie (Estavoyer et al., 1993). Ce sont les animaux les plus sensibles qui sont à l'origine des épizooties les plus importantes : aux Etats Unis, ce sont les lapins sauvages (particulièrement l'espèce *Sylvilagus*) (Sjostedt, 2007) et les rats musqués ; en Europe, se sont les lagomorphes, en particulier les lièvres et les rongeurs (campagnols, souris et mulots) qui sont les plus retrouvés. En Europe centrale, le lièvre constitue le principal vecteur de tularémie, mais la bactérie a également été retrouvée chez l'écureuil, le lapin et le campagnol. En Europe de l'Ouest, la maladie se propage rarement à l'Homme. La seule épidémie, probablement consécutive à une importation de lièvres sauvages, a été enregistrée en Espagne en 1990 (Anda et al., 2001; Pérez-Castrillón et al., 2001).

Le rôle des oiseaux migrateurs en tant que vecteur de la tularémie a été mis en évidence en 2002 (Hansson and Ingvarsson, 2002). Les carnivores (renards, putois, belettes, furets) ainsi que les poules sont assez peu réceptifs à la maladie mais peuvent jouer un rôle mineur de vecteurs passifs dans la transmission de celle-ci.

Les lièvres, les rongeurs du type campagnols et les mulots constituent, en France, l'essentiel du réservoir naturel de la maladie. En effet, ce sont les animaux les plus sensibles et les plus réceptifs à *F. tularensis*. La tularémie semble même être un facteur de régulation de leur population. Les rongeurs et les lièvres contaminés présentent soit des septicémies

mortelles en 2 à 3 jours, soit des formes subaiguës accompagnées d'une asthénie intense et mortelle en une semaine. A l'autopsie, les organes sont congestionnés, la rate présente une augmentation de taille et des micro-abcès sont souvent visibles sur de nombreux organes.

Le chat domestique, bien qu'assez peu réceptif à la maladie, peut la transmettre de manière directe, mais surtout indirecte, en ramenant chez ses propriétaires des rongeurs morts infectés (Eliasson et al., 2002). Chez le chat, l'infection a une traduction clinique variable : formes inapparentes révélées uniquement par sérologie, septicémies mortelles ou infections subaiguës. Dans ce dernier cas, on note de la fièvre, une anorexie, une indifférence, des adénites dans les régions sous-maxillaires et cervicales et des adénites généralisées. Les chats infectés, présentant ou non des signes cliniques, peuvent contaminer l'Homme par morsure ou griffure. Entre 1928 et 1993, 51 cas de tularémie humaine transmise par le chat ont été rapportés dans la littérature scientifique. La transmission de l'infection est liée à la présence de bactéries dans la bouche ou sur les griffes, consécutive à la chasse ou à l'ingestion d'animaux contaminés (Euseby JP). La tularémie est peu documentée sur les chiens et l'espèce semble relativement résistante à l'infection. De même peu de forme bovine de tularémie sont documentées. A l'inverse, des formes équine, ovine et chez le porcelet sont décrites (Euseby JP).

Chez les primates, des formes comparables à la forme typhoïdique de l'Homme ont été mises en évidence, avec une présence de complications pulmonaires et un taux de mortalité pouvant atteindre les 25% en dépit du traitement.

**Arthropodes.** Les arthropodes hématophages (tiques, moustiques, taons, puces, poux) constituent un réservoir inépuisable de vecteurs grâce à une transmission trans-ovarienne indéfinie à la descendance (Avril JL et al, 2000).

Les tiques concernées appartiennent à des espèces différentes selon les continents : *Ixodes ricinus* et *Dermacentor reticulatus* en Europe (Ellis et al., 2002 ; Golubić and Zember, 2001) et *Dermacentor variabilis*, *Amblyoma americanum* et *Dermacentor andersoni* aux Etats-Unis (Machado, 2002). Chez les tiques, la bactérie est principalement présente au niveau des selles et à l'intérieur des glandes salivaires. Les tiques permettent la contamination d'espèces moins sensibles à la bactérie telles les bovins, les ovins et les chiens. Ces espèces possèdent en revanche un potentiel de contamination de l'Homme beaucoup plus élevé que les animaux de la faune sauvage. De plus, une tique peut permettre une contamination par plusieurs espèces de bactéries. Ainsi, une tularémie associée à la maladie de Lyme a été mise en évidence en Croatie en 2001 (Golubić and Zember, 2001). La prolifération de *F. tularensis* serait favorisée dans la tique par des substances contenues dans la salive de celle-ci (Dr Cavallini).

Aux Etats-Unis, les tiques et la mouche du cerf (*Chrysopsdisalis*) sont les vecteurs arthropodes principaux. En Europe centrale et dans les régions traversées par des ruisseaux, des étangs, des lacs et des rivières, les infections dues à la sous-espèce *holarctica* sont principalement dues aux moustiques. En Europe de l'Est, les cas cliniques régulièrement décrits en Russie, au Kazakhstan et au Turkménistan, sont principalement dus aux moustiques et aux mouches, notamment à la mouche de cerf.

Le mode de contamination des insectes piqueurs n'est à ce jour pas totalement connu. L'hypothèse d'une contamination à un stade larvaire via de l'eau souillée par des excréments de castors et de rats musqués infectés semble être la plus probable (Jellinson, W. L., 1950).

### 2.1.3 Surveillance de la tularémie humaine

L'étude épidémiologique des différentes sous-espèces de *F. tularensis* est rendue difficile par la grande diversité des hôtes, l'étendue de leur distribution ainsi que l'irrégularité de leur répartition géographique. De plus, l'activité humaine a un impact important sur l'émergence de la maladie. En effet, depuis 1940, l'exode rural, entraînant l'essor des agglomérations ainsi que la diminution des professions agricoles, a engendré une diminution des cas mondiaux de tularémie. A l'inverse, les périodes de guerre ont conduit à une forte augmentation des cas de tularémie. Cela a été le cas durant la seconde guerre mondiale, notamment en Russie, et plus récemment durant la guerre au Kosovo. Ces cas sont notamment dûs à la dégradation des conditions d'hygiène, ainsi qu'à l'augmentation corrélée des populations de rongeurs (Reintjes, 2002) (voir tableau 3).

Les données exactes concernant le nombre de cas mondiaux ne sont pas connues (Machado, 2002). De plus, une sous-estimation importante, du fait d'affections souvent bénignes et non déclarées, diminue largement les chiffres. Les principales données proviennent des Etats-Unis ainsi que de l'ex-URSS (voir tableau 3).

Aux Etats-Unis, la déclaration obligatoire de la maladie, qui avait disparu en 1994, a été restaurée en 2000, en raison de l'utilisation possible en tant qu'arme de bioterrorisme (Machado, 2002). Le nombre de cas annuels, dépassant les 1000 en 1940, a fortement diminué et oscille actuellement entre 100 et 200 (Feldman KA, 2003 ; Machado, 2002 ; Office international des épizooties et al., 2005). En ex-URSS, le nombre de cas sur le même laps de temps est passé de 100 000 cas annuels à quelques centaines (Euseby JP). En Europe, les principales épidémies de tularémie ont été recensées en Suède, Finlande et au Kosovo.

**Tableau 3 :** Principales épidémies de tularémie recensées dans la littérature. D’après (Mailles and Vaillant)

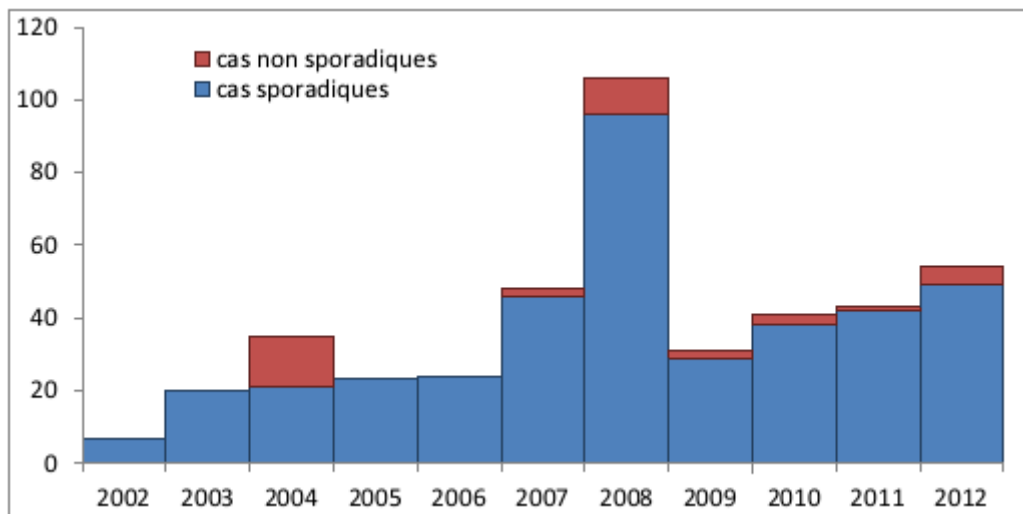
Année, Lieu	Nombre de cas	Origine de la contamination	Remarques	Réf
1978, Velky Tchécoslovaquie	131	Jus de pomme fait maison	Maison de retraite	(Czerny Z et al., 1982)
1978, Marta’s Vineyard Massachussets	7	Aérosol, Chien Vecteur passif	Ile hyper endémique	(Matyas et al., 2007)
1981, Ljudsal, Suède	529	Moustiques	Durée 2 mois	(Christenson, 1984)
1982, Sansepolcro, Italie	45	Contamination réseau d’eau	Lièvres positifs à proximité	(Greco et al., 1987)
1982, Oulu, Finlande	123	Manipulation fourrages, taillage de haie, aérosols	Durée 9 mois	(Syrjälä et al., 1985)
1984, Dakota du Sud	20	Morsures de tiques	Coexistence <i>F. t</i> subsp <i>tularensis</i> et <i>F. t</i> subsp <i>holarctica</i> , enfants	(Markowitz LE et al., 1985)
1997, Smolensk, Russie	Non précisé	Réseau de distribution d’eau	Contamination liée à un défaut d’entretien	(Rogutskiï et al., 1997)
1998 Slivnitza, Bulgarie	262	Rongeurs + lièvres + tiques	Majorité en 1998-99, fin de l’épidémie en 2003	(Kantardjiev et al., 2006)
1998, Espagne	19	Pêche aux écrevisses	Durée 2 semaines	(Anda et al., 2001)
1999, Kosovo	900	Aliments contaminés par des rongeurs	Tout le pays, environ 6 mois	(Reintjes, 2002)
1999, Dagestan	64	Citernes d’eau de boissons ouvertes et tiques	Zone marécageuse	(Tikhenko et al., 2001)
2000, Suède	270	Moustiques, travail à la ferme, chat	Plusieurs régions	(Eliasson et al., 2002)
2000, Marta’s Vineyard, Massachussets	15	Aérosols de poussières provoqués par des tondeuses à gazon	11 pneumopathies	(Feldman et al., 2001)

En France, après avoir été supprimée en 1986, la tularémie a fait son retour dans la liste des maladies à déclaration obligatoire en octobre 2002. Ce retour a pour but de prévenir l'émergence de zone endémique ou l'apparition d'une nouvelle souche éventuellement liée à une utilisation malveillante. Les médecins et biologistes diagnostiquant un cas de tularémie chez un patient, doivent notifier celui-ci à l'Agence régionale de santé (ARS) à l'aide d'une fiche de déclaration standardisée (téléchargeable à [https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa\\_12214.do](https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa_12214.do)). Cette fiche permet de recueillir les données cliniques, les informations sur la nature et les résultats des examens diagnostiqués ainsi que les expositions à des risques connues comme fréquentes dans la littérature.

Sont considérés comme exposition à risque les piqûres de tiques, de moustiques, les contacts directs avec les animaux (en particulier lièvres, rongeurs, lapins sauvages, ruminants, écrevisses), les professions exposant à des animaux ou à un environnement possiblement contaminé par des animaux, les activités de plein air génératrices d'aérosols, de poussières ou exposant à la terre dans les zones géographiques où un réservoir animal est présent (Mailles and Vaillant, 2005).

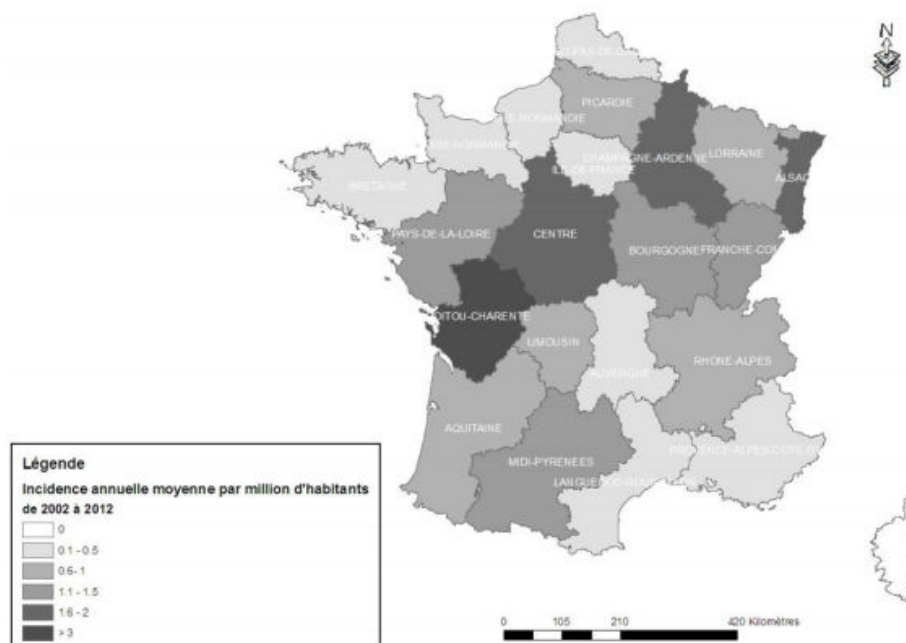
Du 1<sup>er</sup> octobre 2002 au 31 décembre 2012, 434 cas de tularémie ont été diagnostiqués et déclarés en France, soit une incidence annuelle moyenne de 0,07 cas pour 100 000 habitants (voir figure4). Parmi ces cas, 395 étaient des cas sporadiques et 39 appartenaient à 10 épisodes de cas groupés. Un pic de tularémie humaine a été observé durant l'hiver 2007/2008. Cette épidémie a été corrélée à une augmentation des cas de tularémie chez le lièvre à la même période.

**Figure 4 :** Nombre de cas sporadiques et non-sporadiques de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 par année de déclaration. D'après (Mailles and Vaillant, 2012).



Des cas de tularémie ont été retrouvés dans toutes les régions de France à l'exception de la Corse. L'incidence moyenne la plus élevée sur cette période a été enregistrée en Poitou-Charentes (3,2/an/millions d'habitants), en région Centre (1,8/an/millions d'habitants), en Alsace (1,7/an/millions d'habitants) et en Champagne-Ardenne (1,6/an/millions d'habitants) (Mailles and Vaillant) (voir figure 5).

**Figure 5 :** Incidence des cas de tularémie déclarés par région de résidence en France de 2002 à 2012 (Mailles and Vaillant, 2012)



La réceptivité humaine vis-à-vis de la bactérie est totale, quels que soient l'âge et le sexe. La majorité des cas est cependant décrite chez des sujets de sexe masculin, le plus souvent âgés de plus de 30 ans (Raoult D), car ils effectuent les activités potentiellement contaminantes (Mailles and Vaillant, 2012). Aux Etats-Unis (Bryant, 2002; Machado, 2002), toutes les classes d'âge sont concernées avec notamment de nombreux cas chez l'enfant de moins de 10 ans ainsi que chez l'adulte de plus de 50 ans. Aucune différence de sexe/ratio n'est observable chez les enfants. Il est à noter une incidence très forte de la maladie chez les Indiens d'Amérique et notamment dans les réserves du Montana et du Dakota du sud, ceci en raison de leur mode de vie rural.

En ce qui concerne les facteurs professionnels de contamination, une large proportion de la population des travailleurs agricoles est concernée (voir tableau 4). Les bergers, agriculteurs, éleveurs, gardes forestiers et gardes-chasse sont particulièrement exposés (Raoult D). En effet, la simple manipulation d'un animal malade ou mort suffit à provoquer une infection. Les techniciens d'espaces verts (Feldman et al., 2003), employés de parcs zoologiques et ouvriers de chenils sont également touchés (Vaissaire J, 2001). De même, les professions de transformation d'animaux ou de matières animales sont concernées : bouchers, équarisseurs, tanneurs. Les métiers de bouche peuvent éventuellement être touchés et en particulier les cuisiniers, par ingestion de viande insuffisamment cuite ou lors de la préparation culinaire en portant les mains à la bouche après avoir touché de la viande contaminée (vérification de la qualité de marinade avant cuisson par exemple).

Les techniciens de laboratoire et les biologistes exercent une profession à risque et tout spécialement ceux qui sont au contact des léporidés et des petits rongeurs. Pour terminer, les vétérinaires, de par leur contact avec des animaux, ou en laboratoire, ont des risques accrus de contracter la maladie (Feldman, 2003; Raoult D).

**Tableau 4 :** Professions à risque en fonction des cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012. D’après (Mailles and Vaillant, 2012)

Profession à risque	N(%)
Agriculteur/Eleveur	38 (51)
Forestier	12 (16)
Boucher/Cuisinier	7 (9)
Biologiste et technicien de laboratoire de biologie médicale	4 (5)
Vétérinaire/Infirmière vétérinaire	4 (5)
Maraîcher	4 (5)
Paysagiste	3 (4)
Vigneron/Ouvrier viticole	3 (4)
Employé d’animalerie	1 (1)
Equarisseur	1 (1)
Moniteur d’équitation	1 (1)
Vendeur de matériel agricole	1 (1)
Total	79 (100)

Concernant les populations non professionnelles susceptibles d’être infectées par *Francisella*, les chasseurs et les braconniers sont les plus exposés, à la fois aux arthropodes et aux gibiers, ainsi qu’aux cadavres d’animaux morts de tularémie (voir tableau 5). Les jardiniers amateurs, utilisant des moyens mécaniques sont également touchés lors de la tonte du gazon ou du débroussaillage (Feldman et al., 2001), des cadavres de rongeurs pouvant être hachés par les machines utilisées. Les activités de loisirs, notamment en période estivale, sont favorables aux piqûres d’arthropodes.

Enfin, les facteurs socio-économiques défavorables entraînent le développement de rongeurs susceptibles d’établir une contamination de la nourriture ainsi que des réserves d’eau par leurs déjections (Reintjes, 2002).



**Tableau 5 :** Expositions à risque rapportées par les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 (plusieurs expositions possibles pour un même cas). D’après (Mailles and Vaillant, 2012)

Exposition à risque (N=434)	N (%)
Profession	79 (18)
Contact direct non professionnel avec des animaux	311 (72)
- Gibier	
Lièvres	179 (41)
Sangliers	8 (2)
Chevreuils	8 (2)
- Animaux d’élevage	
Lapins	18 (4)
Bovins	2 (0,5)
Caprins	2 (0,5)
Ovins	3 (0,7)
Volailles	8 (2)
- Animaux de compagnie ou de loisir	
Chiens	16 (4)
Chats	13 (3)
Chevaux	5 (1)
- Faune sauvage sauf le gibier	
Rongeurs sauvages	42 (10)
Fouine	1 (0,2)
Renards	1 (0,2)
- Animal non renseigné	49 (10)
Loisirs de plein air	217 (50)
- Chasse	52 (12)
- Jardinage	59 (14)
- Sports	51 (12)
- Rénovation de maison	11 (3)
Morsures de tique	82 (19)
Piqûre de moustique et tabanidé	29 (8)

## 2.2 Modes de contamination, manifestations cliniques, diagnostics et traitements de la tularémie

### 2.2.1 Modes de contamination

La contamination inter-animaux s'effectue principalement par voie cutanée, contact avec d'autres animaux, voie respiratoire, au contact de végétaux contaminés ou de cadavres infectés, ainsi que par voie digestive lors de l'ingestion de cadavres infectés, d'eau ou de grains contaminés (Vaissaire J, 2001). Cette contamination se fait principalement de manière indirecte via le milieu extérieur : le sol pour les rongeurs fouisseurs, l'eau pour les rongeurs semi-aquatiques et par piqûres d'arthropodes.

L'Homme est contaminé de manière accidentelle en pénétrant les foyers naturels de tularémie (Office international des épizooties, 2005). Les modes de contamination ainsi que les voies d'entrée sont multiples (voir figure 6). Un passage cutané ou muqueux est observable lors de la manipulation d'animaux malades ou morts, par contact avec leurs liquides biologiques, ou leur fourrure (Dr Cavallini). Dans ce cas, une dose de 10 à 50 bactéries peut être suffisante pour l'apparition de symptômes (Euseby JP). Le sol et le matériel souillé (clou, lame,...) peuvent être des sources de contamination du revêtement cutané.

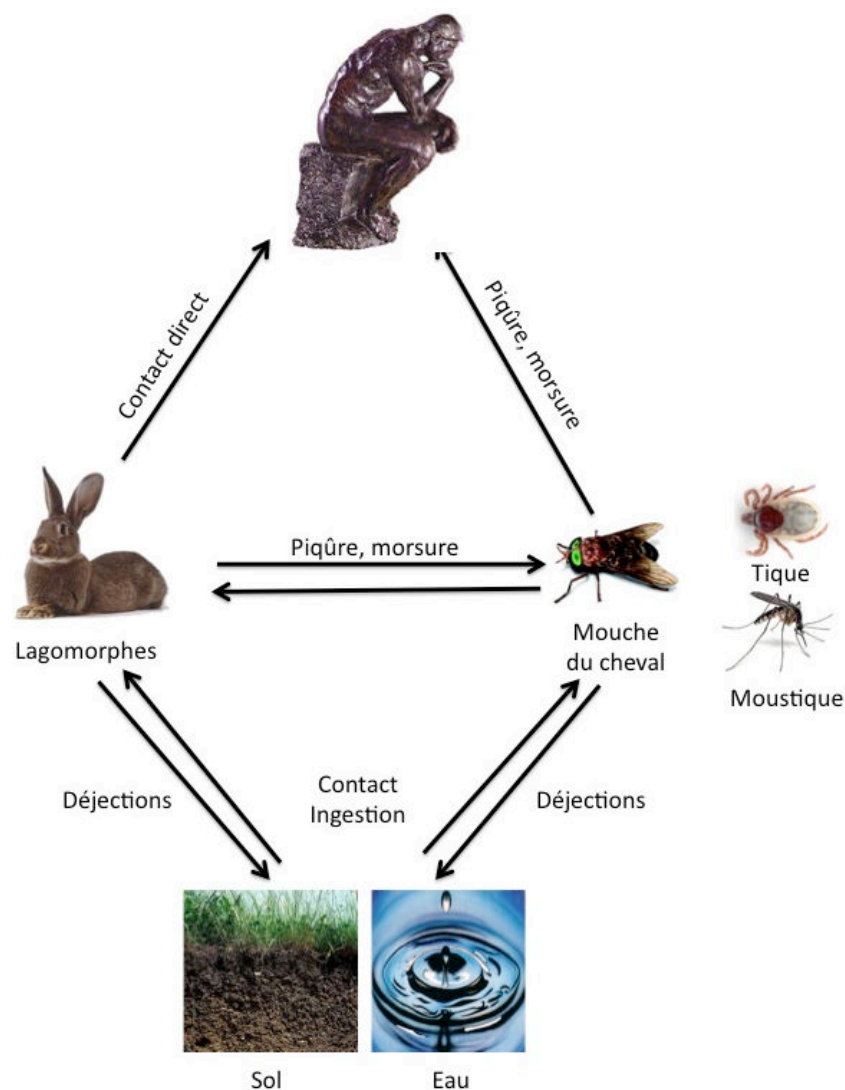
Les muqueuses, plus particulièrement conjonctivales et pharyngées, sont des portes d'entrée en cas de projection ou d'immersion dans un liquide contaminé. Une morsure, même d'un animal sain, peut également être une cause de la tularémie. C'est le cas pour le chat qui est un animal peu réceptif à la maladie, mais dont la gueule peut être contaminée lors de la capture récente d'un rongeur infecté (Euseby JP).

La piqûre d'un arthropode peut être cause de tularémie (voir figure 6). La tique est un cas particulier car elle peut être considérée à la fois comme un réservoir et un vecteur de tularémie (Dr Cavallini). Une contamination digestive peut avoir lieu soit par ingestion d'eau souillée par des urines, des fèces de rongeurs ou les cadavres d'animaux malades. Cette contamination peut aussi être due à l'ingestion de viande contaminée insuffisamment cuite, *F. tularensis* étant détruite en 10 minutes à des températures de 55, 60°C. Ce mode de contamination peut à la fois être la source de cas isolés mais aussi de véritables épidémies, notamment aux Etats-Unis où une contamination du lait a été observée (Bryant, 2002) et en

République Tchèque où la fabrication artisanale de jus de pomme a été incriminée (Cerny Z, 2001).

Enfin, une contamination pulmonaire par inhalation de bactéries aérosolisées a été observée à l'occasion de travaux ruraux (tonte, débroussaillage, battages,...), de la manipulation d'animaux, et notamment de fourrures ou de laine, et lors du changement de litière. Ces aérosols peuvent provenir de poussières de fourrages, de céréales et de laines souillées par des excréments de rongeurs (1997).

**Figure 6 :** Modes de contamination par *Francisella tularensis*



### 2.2.2 Manifestations cliniques

La sensibilité animale à *F. tularensis* dépend de plusieurs facteurs : de la réceptivité de l'espèce animale, de la souche bactérienne et de la voie de contamination. Chez l'animal, tout comme chez l'Homme, une dose de 10 à 50 bactéries est suffisante pour déclencher une infection par voie intradermique ou pulmonaire.

Les espèces animales peuvent être réparties en 3 groupes selon leur réceptivité à *Francisella* :

i) Le premier groupe est constitué d'espèces très réceptives à la tularémie, tels les rongeurs et les lagomorphes. Il est, chez ces espèces, difficile d'observer les symptômes de la tularémie car elles développent très rapidement une forme septicémique fatale. L'inoculation expérimentale d'un lièvre entraîne une hyperthermie et une apathie. L'animal est en boule avec un poil hérissé et se laisse facilement approcher. La mort survient en quelques jours. Les mêmes phénomènes sont observables pour toutes les espèces de ce groupe. Il existe aussi une forme subaigüe accompagnée d'asthénie intense, mortelle en une semaine (Euseby JP).

ii) Le second groupe est constitué par les espèces réceptives mais moins sensibles à la bactérie. Ce groupe contient notamment les primates non humains, les ovins et les oiseaux. Chez ces animaux, l'expression de l'infection est très variable, allant des formes asymptomatiques à des formes mortelles.

iii) Le dernier groupe est constitué des espèces très peu réceptives et quasiment insensibles à la maladie (carnivores). Chez ces espèces, ce sont les formes inapparentes qui sont les plus nombreuses.

Les animaux appartenant au premier groupe sont les principaux responsables de la contamination des autres animaux, des arthropodes, de l'Homme et de l'environnement.

Chez l'Homme, les formes cliniques sont extrêmement variées, que ce soit par leur localisation, leur gravité et leur porte d'entrée. Néanmoins, les formes ganglionnaires restent de très loin les plus caractéristiques (Mailles and Vaillant).

La première phase d'incubation, pouvant durer entre 1 et 15 jours (le plus souvent 3 à 5 jours) (Raoult D), est suivie d'une phase d'invasion d'une durée similaire. Le début de l'infection est le plus souvent brutal, avec une hyperthermie importante, accompagnée de frissons, de céphalées, de sensation de malaise, d'anorexie et d'asthénie. Ce tableau évoquant

un syndrome grippal peut aussi être accompagné de myalgies et de signes digestifs tels des douleurs abdominales, des diarrhées ou des vomissements (Raoult D).

On distingue six formes cliniques principales de la tularémie chez l'Homme. Cette distinction de formes est schématique, car des associations cliniques sont souvent décrites.

i) Formes ganglionnaire et ulcéro-ganglionnaire : il s'agit des formes les plus fréquentes de la maladie (75 à 85% des cas). Le point d'inoculation est cutané et indique l'origine de l'infection. Pour la tularémie ulcéro-ganglionnaire (26% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012), une ulcération cutanée d'un diamètre compris entre 0,5 et 3 cm est observable au point d'inoculation, accompagnée d'une adénopathie satellite (voir figure 7). Cette ulcération est douloureuse, suintante et possède un pourtour rouge. Elle est le plus souvent unique mais parfois multiple. L'évolution de cette lésion se fait sur plusieurs semaines et laisse une cicatrice. Les adénopathies peuvent être multiples et de volume variable. L'évolution de cette pathologie peut se poursuivre durant six mois. Des formes dites ganglionnaires simples (sans formation d'escarre cutanée) sont fréquentes (46% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012). Dans ce cas, on observe une adénopathie simple sans présence d'ulcère et accompagnée d'un syndrome pseudo-grippal. Cette forme est la plus répandue au Japon (Office international des épizooties, 2005).

**Figure 7 :** Illustration de la tularémie ulcéro-ganglionnaire



ii) Formes digestive et pharyngo-ganglionnaire : ces deux formes de tularémie sont en lien car elles résultent soit de l'ingestion de viande consommée avec une cuisson insuffisante, soit de l'absorption d'eau contaminée. La tularémie digestive prend la forme d'une gastro-entérite avec toxémie possible. Des lésions ulcéreuses du tube digestif accompagnées d'adénites cervicales, pharyngées et mésentériques sont observables. La forme pharyngo-ganglionnaire

est peu fréquente (6% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012). Elle se caractérise soit par une pharyngite pouvant passer facilement inaperçue, soit par une angine fébrile (voir figure 8). Un cas a été décrit en 2002 à l'hôpital de Saint-Dizier, faisant suite au plumage d'un canard (Lepilleur et al.).

**Figure 8 :** Illustration de la tularémie pharyngo-ganglionnaire



iii) Forme oculo-ganglionnaire : cette forme concerne 1 à 2 % des malades (2% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012). La transmission est consécutive au contact d'un objet ou de gouttelettes contaminés avec la conjonctive. La contamination est souvent due au frottement de l'œil par des doigts contaminés, à des projections d'eau contaminée, ou à des particules aériennes infectées. Cette forme, touchant la paupière inférieure, entraîne un syndrome oculo-ganglionnaire de Parinaud, c'est-à-dire une conjonctivite purulente, douloureuse et unilatérale (voir figure 9). Cette atteinte oculaire peut se compliquer en ulcère de la cornée (Dr Cavallini).

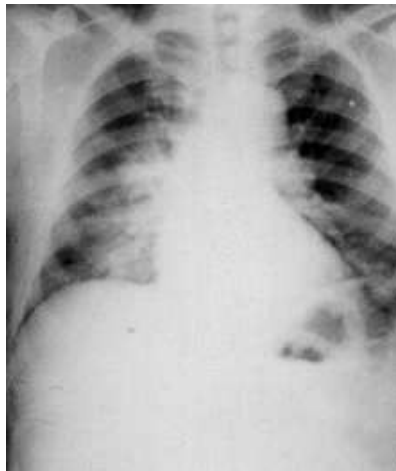
**Figure 9 :** Illustration de la tularémie oculo-ganglionnaire



iv) Forme typhoïdique ou fébrile pure : cette forme septicémique, s'accompagnant de symptômes systémiques sévères, est peu fréquente et ne comporte ni ulcérations cutanées, ni adénopathies (10% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012). Elle a été en premier lieu décrite par le personnel de laboratoire chargé d'autopsier des cobayes et des lapins sauvages. Elle se traduit par une perte de poids, une fièvre et une prostration. Une forme pulmonaire, souvent asymptomatique, y est associée dans environ un cas sur deux (Euseby JP). Ces formes peuvent aussi être la conséquence d'une infection digestive. Le taux de mortalité de cette forme de tularémie peut atteindre les 60% avec la sous-espèce *tularensis* (Sjostedt, 2007).

v) Forme pulmonaire : les formes pulmonaires, rares en France, surviennent après inhalation d'aérosols contaminés par des déjections de tiques (Raoult D), ou des rongeurs déchiquetés par des machines agricoles (10% des cas de tularémie en France de 2002 à 2012). Ces formes sont observées principalement chez les agriculteurs. Dans les années 1966-67, une épidémie impliquant plus de 600 patients a été observée chez des agriculteurs suédois. L'atteinte respiratoire fait partie des signes de gravité de la maladie avec une possibilité de détresse respiratoire et peut mettre en jeu le pronostic vital. Dans cette forme, la fièvre est élevée, accompagnée de manière inconstante des signes suivants : toux sèche, douleurs thoraciques, dyspnée ou crachats hémoptoïques. Des signes radiologiques sont présents dans 50 à 100% des cas (voir figure 10). On retrouve des infiltrats unis ou bilatéraux et des épanchements pleuraux. Cette forme complique la forme ulcéro-ganglionnaire dans 1 à 15% des cas.

**Figure 10 :** Illustration de la tularémie pulmonaire



vi) Il existe également des formes cliniques particulières : asymptomatiques (pouvant atteindre 20% des cas) (Dr Cavallini) ; cutanées (Estavoyer et al., 1993) ; pseudo-typhoïdiques ou hépato-digestives ; pédiatriques (ganglionnaires et pharyngées) ; ou encore des formes cliniques graves (avec atteintes neuroméningées ou septicémiques).

La durée d'évolution de la maladie est de quelques semaines et la convalescence peut prendre des semaines ou des mois, avec des accès de fièvre intermittents (Office international des épizooties, 2005). Le taux de mortalité est de l'ordre de 0,1% en Europe (*F. tularensis* subsp. *holarctica*), mais celui-ci peut atteindre 6% en Amérique du Nord avec la sous-espèce *tularensis*. Sans traitement, le taux de mortalité avec la sous-espèce *tularensis* avoisine les 10% (pour les formes simples) et peut atteindre les 60% pour les formes graves. La mort due à la tularémie est le plus souvent observée dans le cas de formes typhoïdiques, lors de pneumonies ou de complications pulmonaires.

### 2.2.3 Diagnostics de la tularémie

Le polymorphisme des manifestations cliniques de la tularémie entraîne des difficultés lors du diagnostic de présomption clinique, ainsi que lors du diagnostic différentiel. Le diagnostic de référence de la tularémie reste donc biologique. Cependant, la manipulation de prélèvements infectés ou de cultures représente un risque important pour le personnel de laboratoire et ne peut se réaliser que dans des laboratoires spécialement équipés. *F. tularensis*



subsp. *tularensis* nécessite un laboratoire de classe 3, *F. tularensis* subsp. *holarctica* un laboratoire de classe 2 (mais manipulés le plus souvent en laboratoire de classe 3).

Le diagnostic clinique est le plus souvent un tableau fébrile, d'allure grippale, avec une notion de contact avec les animaux dans une zone endémique de tularémie. Lors de la phase d'invasion, un syndrome grippal, une fièvre typhoïde ou une brucellose peuvent être évoqués (Dr Cavallini).

Lors d'une infection à *F. tularensis*, l'hémogramme est normal à l'exception des formes graves dans lesquelles il existe une polynucléose neutrophile (Estavoyer et al., 1993). Les enzymes hépatiques et la créatine phosphokinase sont légèrement augmentés (Dr Cavallini). La formule sanguine et la vitesse de sédimentation demeurent le plus souvent normales (Benlyazid et al., 1997).

La mise en évidence d'une tularémie repose sur trois bases : i) le diagnostic bactériologique ; ii) le diagnostic sérologique et iii) le diagnostic moléculaire.

i) L'analyse bactériologique peut être réalisée à partir de différents prélèvements pathologiques selon la forme clinique de la tularémie.

Les prélèvements doivent être rapidement analysés ou être stockés à 4°C (Vaissaire J et al., 2007). L'analyse microscopique des prélèvements peut se réaliser par coloration de Gram, de May-Grünwald-Giemsa ou par immunofluorescence directe (Vaissaire J et al., 2007). L'isolement de la souche se fait sur des géloses chocolat enrichies avec de l'IsoVitaleX<sup>TM</sup> (BD) ou du PolyViteX<sup>TM</sup> (Biomérieux, AES). Les cultures sont incubées et contrôlées durant un minimum de 10 jours à 37°C en aérobie. L'apparition de colonies peut se faire dès 48H d'incubation. Les cultures en milieu liquide sont réalisées en bouillon thioglycolate, cœur-cerveau, trypticase soja complémenté avec 2% d'IsoVitaleX<sup>TM</sup> ou en bouillon Schaedler. Les caractères d'identification sont une catalase positive, une oxydase négative ou très faiblement positive, une nitrate réductase positive et une uréase négative. Certaines galeries d'identification commerciales (API<sup>®</sup> bioMérieux) conduisent à de fausses identifications, de type *Haemophilus influenzae* ou *Actinobacillus spp.* L'utilisation de la galerie API<sup>®</sup> NH (bioMérieux), permettant la mise en évidence de la fermentation de quelques sucres, de la présence de l'uréase et de la  $\beta$ -galactosidase, est préférable. L'étude de la fermentation du glycérol, de la présence de citrulneuréidase et surtout l'exigence en cystine ou cystéine permet de différencier les souches. La confirmation du diagnostic peut, depuis peu, être

effectuée par agglutination sur lame ou en tube au moyen d'un immun-sérum dirigé contre *Francisella tularensis* (Difco – BD) (Vaissaire J et al., 2007).

ii) Le diagnostic sérologique, est basé sur la recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre la bactérie. Il est actuellement réalisé en première intention et permet le diagnostic de 70 à 90% des cas en France. Chez l'Homme, les anticorps des 3 classes M, A et G apparaissent simultanément entre le 8ème et le 10ème jour d'infection (Bryant KA, 2002). Les anticorps atteignent un titre maximal en 1 à 2 mois et peuvent persister plus de 10 ans. L'antigène utilisé est une suspension de *F. tularensis* stabilisée avec du phénol ou du formol (BD, Bioveta). Des réactions sérologiques croisées sont observées entre *F. tularensis* et *F. philomiragia* ou *F. novicida*. Cependant, ces espèces étant susceptibles de causer des pathologies comparables, ces réactions ne sont pas gênantes. Des techniques de micro-agglutination, d'hémagglutination, d'Elisa ou de Western Blot sont couramment utilisées et ont été développées à partir de plusieurs antigènes (Waag et al., 1995, 1996), dont le LPS d'une souche atténuée de *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Une autre méthode de diagnostic utilise l'intradermo-réaction du patient face à la tularine, un lysat bactérien chauffé une heure à 75°C. L'injection intradermique de 0,1 mL de tularine conduit, chez les individus malades, à une réaction érythémateuse et œdémateuse qui apparaît en 12 à 20 heures et qui atteint un maximum en 48h.

iii) Les techniques de biologie moléculaire permettent l'obtention rapide d'une identification présomptive de la bactérie à partir de séquences spécifiques de son ADN génomique, et ce sans isolement préalable. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la méthode la plus utilisée. Son grand avantage est de permettre de cibler de façon spécifique un agent infectieux même présent en petite quantité dans un milieu qui peut être polycontaminé. Du point de vue de la dangerosité des souches, ainsi que de la culture fastidieuse de *F. tularensis*, cette méthode est particulièrement avantageuse.

Plusieurs marqueurs génétiques ont été caractérisés et sont utilisés pour identifier et discriminer les espèces du genre *Francisella*. L'identification du genre se fait par la mise en évidence des gènes *fopA* ou *tul4*, codants pour des protéines membranaires (Fulop et al., 1996; Higgins et al., 2000), du gène codant la protéine 23 kDa (Golovliov et al., 1997) et de la séquence d'insertion *ISFtu2* (Thomas et al., 2003). Les cibles pour la discrimination des espèces sont la séquence Ft-M19 (Bystrom et al., 2005; Johansson et al., 2004), la séquence d'insertion *ISFtu2* (Petersen et al., 2004), le gène *pdpD* (Nano et al., 2004) et la région RDI

(Broekhuijsen et al., 2003). Des études cliniques ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des formes ulcéro-ganglionnaires, oro-pharyngées et oculo-ganglionnaires de la maladie (Eliasson et al., 2005; Johansson et al., 2004; Kantardjiev et al., 2007). L'utilisation de PCR multiplexes pour la détection simultanée d'agents de risque biologique présents dans un même échantillon, a également été décrite (Skottman et al., 2007; Tomioka et al., 2005).

De nouvelles approches, utilisant la spectrométrie de masse, via des approches de SELDI-TOF-MS (Surface enhanced laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry) (Lundquist et al., 2005; Seibold et al., 2007) ou de MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry) (Seibold et al., 2010) sont actuellement développées. Ces méthodes, performantes et rapides, permettent actuellement l'identification et la discrimination des différentes *Francisellaceae* jusqu'au niveau de la sous-espèce. Cependant, les méthodes actuelles ne pouvant être utilisées que sur des bactéries en culture, des avancées technologiques sont possibles. Ces approches de spectrométrie de masse, performantes et rapides, font aussi l'objet de recherches pour la détection simultanée des différents agents de bioterrorisme (virus, bactéries, toxines).

#### 2.2.4 Traitement et prophylaxie

Malgré les efforts mis en place pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des malades, l'issue de la tularémie peut être fatale ou conduire à des complications et à de longues semaines de convalescence. Afin d'obtenir une prise en charge rapide de la maladie, deux approches sont possibles : l'antibiothérapie ou la vaccination.

En France, la prophylaxie n'est pas réglementée. Celle-ci est avant tout d'ordre sanitaire. Elle passe par une information des gardes-chasse, des forestiers et des personnes pratiquant des sports de plein air, quant à la manipulation d'animaux morts ou au risque de piquûre par des arthropodes. Une enquête, effectuée dans une zone endémique, a permis de mettre en évidence que 14% des vétérinaires sont séropositifs à la tularémie contre 1% dans le reste de la population.

**Traitement curatif: l'antibiothérapie.** On distingue le traitement antibiotique prophylactique post-exposition, destiné aux sujets ayant pu être exposés à *F. tularensis* et le traitement curatif destiné aux patients atteints de la tularémie. La streptomycine a été pendant longtemps considérée comme l'antibiotique de choix pour traiter la tularémie (97% de guérison). Plus récemment, d'autres aminosides l'ont supplanté en raison de leur moindre toxicité cochléo-vestibulaire (Johansson et al., 2002). Après de nombreuses recherches cliniques, la gentamicine, particulièrement efficace sur les formes sévères de la maladie, a remplacé la streptomycine. Celle-ci est toujours utilisée lors des formes pulmonaires, en association avec la ciprofloxacine. Les tétracyclines et le chloramphénicol ont aussi été utilisés mais, étant des antibiotiques bactériostatiques, ils exposaient les malades à un risque de rechute (respectivement de 12 et 21%) (Johansson et al., 2002). Le traitement actuel, qui paraît le plus efficace et le plus pratique, est effectué au moyen de fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine, péfloxacine) (Bryant KA, 2002). Leur efficacité a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Johansson et al., 2002). Ainsi, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé préconise la ciprofloxacine (ou éventuellement l'ofloxacine ou la lévofloxacine) comme traitement de première intention. Les céphalosporines de troisième génération, actives *in vitro*, ne sont pas toujours actives *in vivo*. La durée d'administration est de 21 jours avec une tétracycline ou de 14 jours avec une fluoroquinolone.

**Traitement préventif: la vaccination.** Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, l'incidence de la maladie, en particulier aux Etats-Unis et en Russie, a conduit à des études pour le développement d'un vaccin contre la tularémie. Les recherches russes entre les années 1930 et 1940, ont permis le développement de vaccins utilisant des souches vivantes atténuées qui semblaient fournir une protection efficace contre la maladie en stimulant à la fois la réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire (Tigertt, 1962). Les premières vaccinations humaines ont débuté en 1942, fournissant une protection durant une période de six mois post-vaccination. La souche vivante atténuée, après son emploi sur plusieurs milliers d'individus, a été perdue. Par la suite, l'efficacité de plusieurs autres souches atténuées ont été évaluées. La « souche 15 », par exemple, a été utilisée pour la vaccination de 950 personnes dans une zone endémique de tularémie. Cette vaccination a permis de faire passer le taux d'infection de 4,3% à 0,36% (El'bert B.I et al., 1947). Entre les années 1946 et 1960, 60 millions d'habitants de l'URSS ont été vaccinés par scarification ou inhalation de souches vaccinales. D'un point de vue expérimental, l'administration d'un aérosol de ce vaccin à des singes et à des cochons

d'Inde a été jugée d'une efficacité au moins identique à celle de son administration par voie cutanée (scarification) (Dr Cavallini). Cette vaccination, pour laquelle les scientifiques soviétiques recommandaient un rappel annuel suivi d'un rappel tous les 5 ans (Sjostedt, 2007), a permis une réduction considérable du nombre de cas humains (Ellis et al., 2002). Cependant, la vaccination par cette souche diminuerait la fréquence et la sévérité de la maladie, mais ne la préviendrait pas totalement (Benlyazid et al., 1997). En 1956, un des vaccins vivants atténués a été exporté aux Etats-Unis où la bactérie a été isolée. Cette bactérie a été nommée *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS pour « Live Vaccine Strain » (Eigelsbach and Downs, 1961). L'évaluation de l'efficacité de cette souche a mis en évidence que la vaccination par la souche LVS diminuait l'incidence de la tularémie pulmonaire mais n'avait pas d'effet sur la tularémie ulcéro-ganglionnaire (Burke, 1977). De plus, cette souche ne protège pas tous les individus vaccinés et les mutations ayant conduit à son atténuation sont inconnues (Sjostedt, 2007). Plus grave, il semble que dans certaines conditions, la culture de la souche LVS puisse conduire à l'obtention d'un variant faiblement immunogène (Eigelsbach and Downs, 1961).

Aux Etats-Unis, la vaccination est uniquement recommandée pour les personnels de laboratoire manipulant ce germe de manière habituelle et pour les forestiers en zone endémique. En France, la fréquence de la maladie ne justifie pas la mise en place d'un programme de vaccination.

Actuellement, un vaccin vivant atténué, utilisant le biovar *paleartica* de *F. tularensis* est utilisé dans des cas de vaccinations restreintes, notamment aux Etats-Unis, sur des populations à haut risque (Sandström, 1994). Ce vaccin semble permettre une immunité sur une durée variant entre 5 et 9 ans. D'autres vaccins, utilisant des souches atténuées, tuées par la chaleur ou des sous-unités de la souche LVS de *F. tularensis* subsp *holarctica* sont en cours d'évaluation par la Food and Drug Administration américaine (De Pascalis et al., 2012).

### 3. *Francisella* et la guerre biologique

L'idée d'utiliser la maladie, pour affaiblir ou éliminer un ennemi, est apparue très tôt dans l'Histoire des civilisations. Bien avant la découverte des bactéries et virus, les armées d'invasion ou de défense ont utilisé ces procédés pour obtenir la victoire à moindre coût. De l'atteinte à la vie ou à la santé de la personne, en passant par la destruction des récoltes ou du bétail, les approches de guerre biologique sont multiples.

Dans ce chapitre, j'aborderai dans une première partie la classification des armes biologiques et dans une seconde partie l'implication de *Francisella* dans la guerre biologique

#### 3.1 Classification des armes biologiques

Depuis le début du XXème siècle, de nombreux spécialistes ont tenté de construire une classification des armes biologiques. En 1947, le microbiologiste américain Théodor Rosenbury énonçait les dix critères qui, selon lui, devaient rendre compte de l'efficacité d'un agent en tant qu'arme biologique (Les armes chimiques et biologiques, Daniel Riche, Patrice Binder) :

- Son pouvoir infectant doit être élevé pour la plupart des sujets humains ;
- L'incubation de la maladie doit être courte et la morbidité élevée ;
- Il doit pénétrer rapidement dans l'organisme par le maximum de voies (respiratoires, digestives, cutanées) ;
- Il doit posséder un potentiel de contagiosité élevé ;
- Il doit se prêter à une production massive et ne pas présenter d'atténuation de virulence pendant la fabrication, le stockage ou la dissémination ;
- Il doit pouvoir résister à la décontamination spontanée ou artificielle ;
- Sa détection et son identification doivent être aussi difficiles que possible ;
- Il doit laisser les populations visées dépourvues de moyen d'immunisation ;
- Le traitement de la maladie provoquée doit être sinon impossible, du moins très difficile ;
- L'agent doit présenter un danger très réduit d'action en retour pour l'utilisateur qui doit pouvoir se protéger contre lui.

Depuis 1999, les agents biologiques critiques pour la santé publique ont été classés, par un comité d'experts du « Center for Diseases Control and Prevention » (CDC), en trois catégories : A, B et C (Rotz et al., 2002). Cette agence gouvernementale américaine, dont le centre principal se trouve à Atlanta, a comme prérogatives la protection de la santé et de la sécurité publique. L'un de ces rôles est la surveillance internationale de l'émergence des maladies infectieuses, dont celles associées au bioterrorisme. Cette classification hiérarchisée prend en compte la facilité de dissémination, la transmission inter-humaine, la mortalité, les conséquences en terme de santé publique et de perturbation sociale, les exigences en terme de diagnostic et de surveillance (voir tableau 6).

La catégorie A comprend les pathogènes de haute priorité, dont l'utilisation aurait un impact majeur sur la santé publique et pourrait provoquer une désorganisation des structures économiques et sociales. Ils peuvent être produits et disséminés de façon aisée. Ces agents présentent une létalité importante et sont transmissibles par voie respiratoire. Les agents de la catégorie B sont faciles à disséminer mais présentent une morbidité modérée ainsi qu'une faible létalité. Ils possèdent donc un impact moins élevé sur la santé publique. Ils nécessitent cependant la mise en œuvre de procédures de diagnostic et d'un système de surveillance approprié. La catégorie C regroupe les agents ne représentant pas un haut risque, mais dont la modification, pour favoriser une dissémination de masse, est envisageable. Ils sont plus disponibles, plus faciles à produire et leur utilisation pourrait engendrer une mortalité élevée.

Cette classification est souvent utilisée comme référence et mise à jour par d'autres organismes nationaux, européens ou internationaux.

**Tableau 6 :** Classification des agents de bioterrorisme potentiels (Rotz et al., 2002)

Agents Biologiques	Maladies provoquées
Catégorie A	
<i>Variola</i>	Variole
<i>Bacillus anthracis</i>	Charbon
<i>Yersinia pestis</i>	Peste
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie
Filovirus et Adenovirus (ex : <i>Ebola</i> , <i>Laasa</i> )	Fièvres hémorragiques
Catégorie B	
<i>Coxiella burnetii</i>	Fièvre Q
<i>Brucella</i> spp.	Brucellose
<i>Burkholderia mallei</i>	Morve
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Mélioïdose
Alphavirus	Encéphalite
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Typhus
Toxines (ex : Enterotoxine B de <i>S. aureus</i> , Ricine)	Syndromes toxiques
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psittacose
Agents menaçants pour la sécurité alimentaire ( <i>Salmonella</i> spp. <i>E. coli</i> O157 :H7)	Syndromes digestifs
Agents transmissibles par l'eau ( <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> )	Syndromes digestifs
Catégorie C	
Agents émergents (ex : virus <i>Nipah</i> , hantavirus)	Fièvres hémorragiques

En France, la classification réalisée par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) est basée sur celle du CDC mais est complétée par des agents biologiques ayant des spécificités épidémiologiques nationales. La « Health Protection Agency » en Angleterre, ainsi que l'Agence Européenne du médicament, répertorient les



agents du risque biologique sur une base commune au CDC et établissent des recommandations concernant les agents des différentes catégories.

### 3.2 *F. tularensis*, un agent de bioterrorisme de première catégorie

La primauté des cas de guerre biologique documentés semble revenir à *F. tularensis* au 14<sup>ème</sup> siècle avant Jésus Christ dans la région de Zemar, en actuelle Syrie. En effet, vers - 1.350, la région connaît de nombreux envahissements. De l'appartenance à l'Egypte, elle devient tour à tour Hittite puis sous contrôle du peuple Arzawas (Trevisanato, 2007). Lors de leur fuite face aux armées d'Arzawas, les Hittites auraient laissé volontairement derrière eux des béliers contaminés par la tularémie, qui auraient décimé les troupeaux des envahisseurs. Ces cas d'attaques microbiologiques ont été mis récemment en lumière par l'étude des courriers diplomatiques du pharaon Akhenaton.

Beaucoup plus tard, la découverte en 1911 d'une bactérie responsable de la mortalité de l'écureuil et du lapin en Californie entraîne le début des études sur *F. tularensis*. Le potentiel infectieux humain de cette bactérie ne sera mis en évidence que dans les années 1930 avec des cas d'infections humaines et d'épizootie en Europe, en Union Soviétique et aux Etats Unis. Rapidement, ce potentiel infectieux est exploité dans le but de réaliser des armes bactériologiques. En témoignent les études japonaises de l'unité 731 du docteur Shiro Ishii dès 1932 (Harris, 1992). Cette bactérie semble également avoir été rapidement militarisée par l'Union Soviétique. En effet, un ouvrage d'Alibek (Frischknecht, 2003), directeur adjoint du programme d'armement russe « Biopreparat » durant de nombreuses années, suggère que l'épidémie ayant touché plusieurs milliers de soldats russes et allemands sur le front de l'Est lors de la seconde guerre mondiale serait due à une dissémination intentionnelle de la bactérie.

Entre 1952 et 1973, les américains, dans le cadre de leurs recherches sur l'armement biologique à Fort Detrick, testent de nombreux agents infectieux sur des volontaires (jeunes recrues de l'armée, prisonniers des pénitenciers, objecteurs de conscience, adventistes du septième jour,...) dans le cadre du projet Whitecoat. Des essais sont plus particulièrement réalisés entre 1955 et 1957 avec différentes souches de *F. tularensis* (Christopher et al., 1997). Ces essais, avec des doses variables d'aérosols et des gouttelettes de taille croissante, ont permis de prouver l'efficacité et le potentiel de dissémination de *Francisella*. A la fin des années 1960, *F. tularensis* faisait partie des agents biologiques militaires stockés par l'armée américaine. D'après Alibek (Christopher et al., 1997), l'Union Soviétique continua les

recherches sur *Francisella* jusque dans les années 1990 et développa des souches résistantes aux antibiotiques et aux vaccins.

Pour mesurer la dangerosité de *F. tularensis*, un comité d'experts de l'Organisation Mondiale de la Santé estima en 1969 que la dispersion par aérosols de 50 kg d'une souche virulente de *F. tularensis* au-dessus d'une ville peuplée de 5 millions d'habitants ferait 250 000 victimes dont 19 000 morts. De plus, la persistance de la maladie serait de plusieurs semaines et les individus vaccinés ne seraient pas totalement protégés. L'estimation du coût de la prise en charge d'un tel attentat pour une nation serait de l'ordre de 5,4 milliards de dollars (Kaufmann et al., 1997).

## **Chapitre II : Relations hôtes pathogènes lors de l'infection par *Francisella tularensis***

*F. tularensis* est une bactérie à multiplication intracellulaire facultative, capable d'infecter une large variété de cellules eucaryotes, des phagocytes professionnels comme les macrophages aux cellules non phagocytaires comme les hépatocytes, les cellules alvéolaires et les érythrocytes (Horzempa et al., 2011). *Francisella* est aussi en mesure d'échapper à la destruction par les polynucléaires neutrophiles (McCaffrey and Allen, 2006). Des études par criblage de banques de mutants ont permis de mettre en évidence les principaux gènes impliqués dans la virulence de *F. tularensis* (Meibom and Charbit, 2010; Pechous et al., 2009). Cependant, la fonction de bon nombre de ces gènes est toujours inconnue à ce jour. De plus, les mécanismes moléculaires, ainsi que la nutrition de la bactérie lors de sa phase intracellulaire demeurent mal compris. Récemment, certains aspects du trafic cellulaire de *Francisella* ont été élucidés. Un ensemble de récepteurs, impliqués dans le processus d'internalisation, ainsi que des éléments essentiels impliqués dans l'échappement du phagosome et dans la prolifération cytosolique, ont été découverts (Asare and Kwaik, 2010; Balagopal et al., 2006; Checroun et al., 2006; Chong and Celli, 2010; Nano et al., 2004; Sjostedt, 2006). En 2009, une étude du profil transcriptionnel durant l'infection de macrophages murins de moelle osseuse par la souche SCHU S4 de *F. tularensis* subsp *tularensis*, a permis de mettre en évidence des changements transcriptionnels majeurs, illustrant bien l'adaptation de la bactérie à son hôte (Wehrly et al., 2009).

A l'instar de nombreux pathogènes intracellulaires, tels que *Coxiella burnetii* (Paretsky, 1990), *Legionella pneumophila* (Dowling et al., 1992) ou *Listeria monocytogenes* (Drevets and Bronze, 2008), la virulence de *F. tularensis* repose sur sa capacité à survivre et se multiplier dans les cellules phagocytaires. Pour cela, *F. tularensis* a élaboré de remarquables stratégies pour envahir le macrophage et faire face à l'environnement hostile du phagosome. Afin de résister au processus de phagocytose, *F. tularensis* empêche la formation du phagolysosome, s'échappe de la vésicule de phagocytose et atteint le cytoplasme dans lequel elle est apte à se multiplier. Cette étape de sortie du phagosome est déterminante pour la virulence de *F. tularensis* car les souches incapables de la réaliser sont totalement atténuées.

Dans une première partie, je rappellerai brièvement les mécanismes mis en place par l'hôte afin de lutter contre les infections par des bactéries intracellulaires, en m'attardant notamment sur le cas du macrophage, principale cellule infectée par *Francisella*. Dans un second temps, je traiterai du cycle de vie intra-macrophagique de *F. tularensis*. Dans une dernière partie, je m'intéresserai aux bases moléculaires de la virulence de cette bactérie.

## 1. Réaction de l'hôte face à l'infection intracellulaire : immunité innée et cas du macrophage

L'efficacité de l'immunité anti-infectieuse repose sur l'activation rapide et puissante d'une grande variété de réponses adaptées aux pathogènes. Pour cela, au cours de l'évolution, la pression exercée par la multitude des pathogènes, a conduit à une diversité et une complémentarité des réponses immunitaires.

Dans cette partie, je traiterai succinctement du rôle de l'immunité innée, particulièrement impliquée dans la défense contre les pathogènes intracellulaires, avant de m'intéresser plus spécifiquement à l'action du macrophage, principale barrière face à l'infection par *Francisella*.

### 1.1. L'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de protection contre les agents pathogènes. Ce mécanisme de défense non spécifique est déployé par l'hôte immédiatement ou quelques heures après exposition à un antigène. Les mécanismes de défense de l'immunité innée sont principalement les cellules phagocytaires, tels les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.

Il existe 4 composants majeurs de cette immunité :

**Les barrières anatomiques :** Elles sont le premier obstacle à l'entrée d'un pathogène. Ainsi, la peau et les muqueuses constituent une barrière efficace contre l'entrée de la plupart des micro-organismes. Les différents mécanismes permettant à ces barrières d'intervenir sont l'action mécanique (desquamation de la peau, faible hygrométrie, jonctions étroites entre les cellules, sécrétion de mucus,...), l'action chimique (pH acide de l'estomac et de certaines muqueuses, lysosyme, défensines, autres peptides antimicrobiens), l'action microbiologique (effet barrière de la flore commensale, production de peptides antimicrobiens) et l'action des IgA sécrétoires (neutralisation de l'adhérence des bactéries au niveau de l'épithélium, opsonisation, activation du complément).

**Le complément** : C'est un groupe de 35 protéines retrouvées dans le sérum dont l'activation en cascade conduit à la lyse de la bactérie par un complexe lytique (protéines C5 à C9) et à l'amplification de la réponse inflammatoire (augmentation de la perméabilité vasculaire, opsonisation, chimiotactisme et activation des cellules phagocytaires). Il existe 3 voies d'activation de processus de défense innée : la voie classique, activée par les complexes antigènes-anticorps ; la voie des lectines, activée par la fixation de certains carbohydrates bactériens sur la lectine MBL et la voie dite alterne, mise en route par la fixation de la protéine C3 à la surface de la membrane bactérienne.

**Les cytokines** : Particulièrement les interférons et les interleukines sont des protéines de l'immunité innée qui permettent, entre autres, l'activation des macrophages, des lymphocytes natural killer et des lymphocytes T.

**Les cellules phagocytaires** : Plus spécifiquement les polynucléaires neutrophiles, qui sont les plus retrouvés, et les macrophages. L'action bactéricide des polynucléaires neutrophiles est plus efficace que celle des macrophages du fait de leur dégranulation plus rapide et de la présence d'enzymes lysosomales spécifiques (Lee et al., 2003). En conditions physiologiques, ils sont présents en grand nombre dans le sang mais sont absents des tissus. En cas d'infection, ils migrent très rapidement vers le site inflammatoire. Cette migration fait suite à la présence au lieu de l'inflammation de facteurs chimioattractants tels les peptides signaux de protéines bactériennes, la protéine C5 activée du complément ou les chimiokines.

## 1.2. Le cas du macrophage

La phagocytose des bactéries par les cellules phagocytaires et particulièrement par le macrophage, entraîne leur destruction. Deux phénomènes principaux sont à l'origine de cette destruction :

- Le « Burst respiratoire », provoqué par la production de dérivés oxygénés appelés ROS (Reactive oxygen Species). Il est induit par un déclenchement du stress oxydant de la cellule phagocytaire.
- La libération d'enzymes bactéricides ou de peptides cytotoxiques contenus dans les lysosomes (Sies, 1991).

D'autre part l'apoptose, l'autophagie, l'intoxication métallique, les peptides antimicrobiens ainsi que la restriction en nutriment interviennent dans la destruction de la bactérie.

La maturation du phagosome débute par l'acidification de la vésicule due à l'incorporation dans sa membrane de pompes à protons. La composition du milieu interne est ensuite modifiée par des interactions entre le phagosome et des endosomes précoces, puis des endosomes tardifs et des lysosomes, pour former le phagolysosome. Le milieu interne de cette vésicule contient des molécules oxydantes, des peptides antibactériens et des hydrolases acides lysosomales, qui vont permettre la destruction de la bactérie (Aderem and Underhill, 1999; Desjardins et al., 1994; Haas, 1998). Ces étapes de maturation du phagosome sont observables par la mise en évidence du recrutement de marqueurs spécifiques à la surface des endosomes (Anthony et al., 1991; Clemens et al., 2004).

Dans cette partie, nous traiterons de l'effet de ces différents mécanismes de destruction sur les bactéries phagocytées.

### **1.2.1 Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS)**

La phagocytose par les macrophages est couplée à l'hyperactivité oxydative, c'est-à-dire à la production d'espèces réactives de l'oxygène toxiques pour les microorganismes. En effet, ces dérivés de l'oxygène entraînent une peroxydation lipidique, une oxydation des acides nucléiques, une carbonylation des protéines ainsi qu'un détachement du fer du site actif de certaines protéines (Imlay, 2003). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites au niveau de la membrane phagosomale par un complexe enzymatique appelé NADPH oxydase. C'est un complexe, inactif dans les macrophages non activés, constitué des protéines gp91<sup>phox</sup> et p22<sup>phox</sup> et de 4 protéines cytoplasmiques : p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> et Rac qui s'assemblent à la membrane du phagosome lors de sa formation (Nunes et al., 2013). Ce complexe utilise l'oxygène moléculaire pour produire une grande quantité d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). De façon spontanée, l' $O_2^{\cdot-}$  est transformé en peroxyde d'hydrogène qui à son tour, est transformé en un autre radical toxique, l'hydroxyle. Cette production de radicaux oxydants est désignée sous le nom de « burst oxydatif ».

### 1.2.2 Les intermédiaires réactifs de l'azote (RNI)

Le monoxyde d'azote, une autre espèce radicalaire, est un précurseur d'espèces très réactives de l'azote comme les peroxynitrites, connus pour leur fort pouvoir antibactérien. Le monoxyde d'azote est produit par les NO synthases, induites soit de manière constitutive, soit par des mécanismes dépendants du calcium ou de signaux cytokiniques (iNOS) (Flannagan et al., 2009). Le mécanisme de destruction bactérienne par les RNI est similaire à celui exercé par les ROS. Une étude de 2005 (Zaki et al., 2005) a permis de mettre en évidence une fixation des iNOS à la membrane des particules phagocytées.

### 1.2.3 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des peptides multifonctionnels jouant notamment un rôle dans l'élimination des micro-organismes. Les deux principales familles de PAM intervenant au niveau de l'immunité macrophagique sont les défensines et les cathélicidines. Ces deux familles, qui font partie des PAM cationiques à large spectre d'action, conduisent à la lyse de la bactérie par la formation de pores dans la membrane et l'endommagement de l'ADN (Hancock and Diamond, 2000; Lehrer et al., 1993). Chez les vertébrés, plus de 100 défensines différentes ont été mises en évidence. Chez l'Homme, seules les défensines  $\alpha$  et  $\beta$  sont présentes (Izadpanah and Gallo, 2005). Elles sont composées de trois feuillets  $\beta$  incluant une boucle en épingle à cheveu. Chez l'Homme, un seul PAM appartenant à la famille des cathélicidines, appelé LL-37 existe. L'expression de LL-37, tout comme celle de certaines défensines est dépendante de la fixation de la vitamine D à son récepteur VDR, présent à la surface des macrophages (Liu, 2006; Liu et al., 2007; Nickel et al., 2012). Cette induction des peptides antimicrobiens explique en partie l'activité antimicrobienne de la vitamine D et son rôle protecteur contre différentes infections (Martineau et al., 2007). L'action antimicrobienne des cathélicidines est particulièrement puissante sur *Shigella* spp, *Staphylococcus aureus* et les *Streptocoques* (Guaní-Guerra et al., 2010).

Pour terminer, les PAM jouent un rôle pro-inflammatoire et chimioattractant permettant ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire innée et adaptative (van der Does et al., 2010; Méndez-Samperio, 2008; Yang et al., 2001).



#### 1.2.4 L'autophagie

L'autophagie est un mécanisme qui participe à l'homéostasie cellulaire. Il permet par exemple, de lutter contre la sénescence métabolique en éliminant les mitochondries détériorées, grandes productrices de dérivés nocifs de l'oxygène, ou en détruisant des amas protéiques trop gros pour être dégradés par le protéasome (Mizushima and Komatsu, 2011). L'autophagie permet aussi une protection vis-à-vis des micro-organismes et notamment des bactéries. Elle se manifeste par l'apparition dans le cytoplasme, de vésicules délimitées par une double membrane, appelées autophagosomes. L'origine de ces membranes, issues du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi ou des mitochondries, n'est pas encore déterminée totalement à ce jour (Rubinsztein et al., 2012). Le processus d'autophagie débute par l'élongation d'une portion de membrane, appelée phagophore qui, en se refermant, forme l'autophagosome. Cet autophagosome peut, par la suite, fusionner avec un lysosome et ainsi permettre la dégradation du contenu cytoplasmique présent dans la vésicule (Randow and Münz, 2012).

De nombreux gènes, appelés *atg* pour « autophagy-related-genes », modulent l'autophagie. Chez l'homme, ils sont au nombre de 35 et possèdent des fonctions très diverses (protéines de membrane, protéines kinases, protéase, lipase,...). L'initiation de l'autophagie peut se faire par plusieurs stimuli : le stress nutritionnel, la carence en facteur de croissance, la déplétion en énergie, un stress du réticulum, la présence de la protéine p53 au niveau du noyau, des signaux immunitaires (PAMPs, DAMPs, PRRs, TLR,...), l'activation de récepteur de surface (Fcγ, CD46, CD40), les infections intracellulaires (virus, parasites, bactéries) et les toxines bactériennes. Ces stimuli induisent la présence de PI3P à la membrane via le recrutement de Vps34 sous la forme d'un complexe comprenant les protéines ATG6 et ATG14L. L'élongation est mise en route via la protéine LC3 (ATG8), recrutée via les protéines ATG5, ATG12 et ATG16L1. Cette protéine LC3, présente et détectable à la surface des phagophores dès leur formation, interagit avec les phosphatidylethanolamines (PE) de la membrane (Singh, 2006). Une fois l'autophagosome formé, celui-ci est alors dirigé vers les lysosomes par un mécanisme dépendant de Rab-7, afin de permettre la dégradation de son contenu. Ce mécanisme est particulièrement intéressant car il permet de passer outre l'inhibition de la maturation des phagosomes mis en place par certains parasites intracellulaires.

### 1.2.5 L'apoptose et la pyroptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée, sans inflammation ni dissémination du contenu cytosolique dans le milieu extérieur. C'est le mécanisme naturel de mort de la plupart des cellules humaines. C'est aussi un processus de défense contre les bactéries à croissance intracellulaire. En effet, l'apoptose est caractérisée par la segmentation de l'ADN et le maintien de l'intégrité membranaire. Elle permet donc de restreindre la dissémination des bactéries intracellulaires dans l'organisme et de faciliter leur dégradation. Les corps apoptotiques, contenant les pathogènes, sont plus facilement éliminés par les autres macrophages. Ils facilitent donc la présentation antigénique, après capture par les cellules dendritiques, et par conséquent la réponse immunitaire adaptative (Lai and Sjostedt, 2003; Lai et al., 2004).

L'apoptose, médiée par la cascade protéique des caspases, peut être activée par différents mécanismes comme la fixation du TNF $\alpha$  à son récepteur, la production de ROS ou de diverses toxines bactériennes (Facteur létal de *B. anthracis*, toxine diphtérique, hémolysine A d'*E. coli*, listériolysine O, PorB de *Neisseria gonorrhoeae*, ...) (Bannerman and Goldblum, 2003; Carrero et al., 2004; Kirby, 2004; Komatsu et al., 1998; Sansonetti, 2000; Weinrauch and Zychlinsky, 1999). Plus précisément, deux voies sont en mesure d'activer l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (voir figure 11). La voie intrinsèque passe par l'activation d'un récepteur de mort au niveau de la membrane plasmique (FasL, TNF-R1, Apo2/Apo3,...). Ce récepteur, transmettant un signal apoptotique externe, active la machinerie de mort programmée de la cellule et entraîne l'activation des caspases-3 et 7 puis l'apoptose (Ashida et al., 2011). La voie intrinsèque est initiée par le relargage de facteurs de signalisation de la mitochondrie, concomitant à la perte de l'intégrité membranaire de celle-ci. Ces facteurs mitochondriaux entraînent l'activation de la protéine BH3 (Bcl-2 homology 3), qui permet d'inhiber l'effet de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. De plus, la protéine BH3 activée permet l'oligomérisation de deux protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak, au niveau de la membrane mitochondriale, entraînant la sortie du cytochrome c. Ce cytochrome c entraîne la formation d'un complexe multiprotéique : l'apoptosome. Celui-ci permet l'activation de la caspase-9 qui déclenche la cascade d'activation des caspases, puis l'apoptose (Ashida et al., 2011).

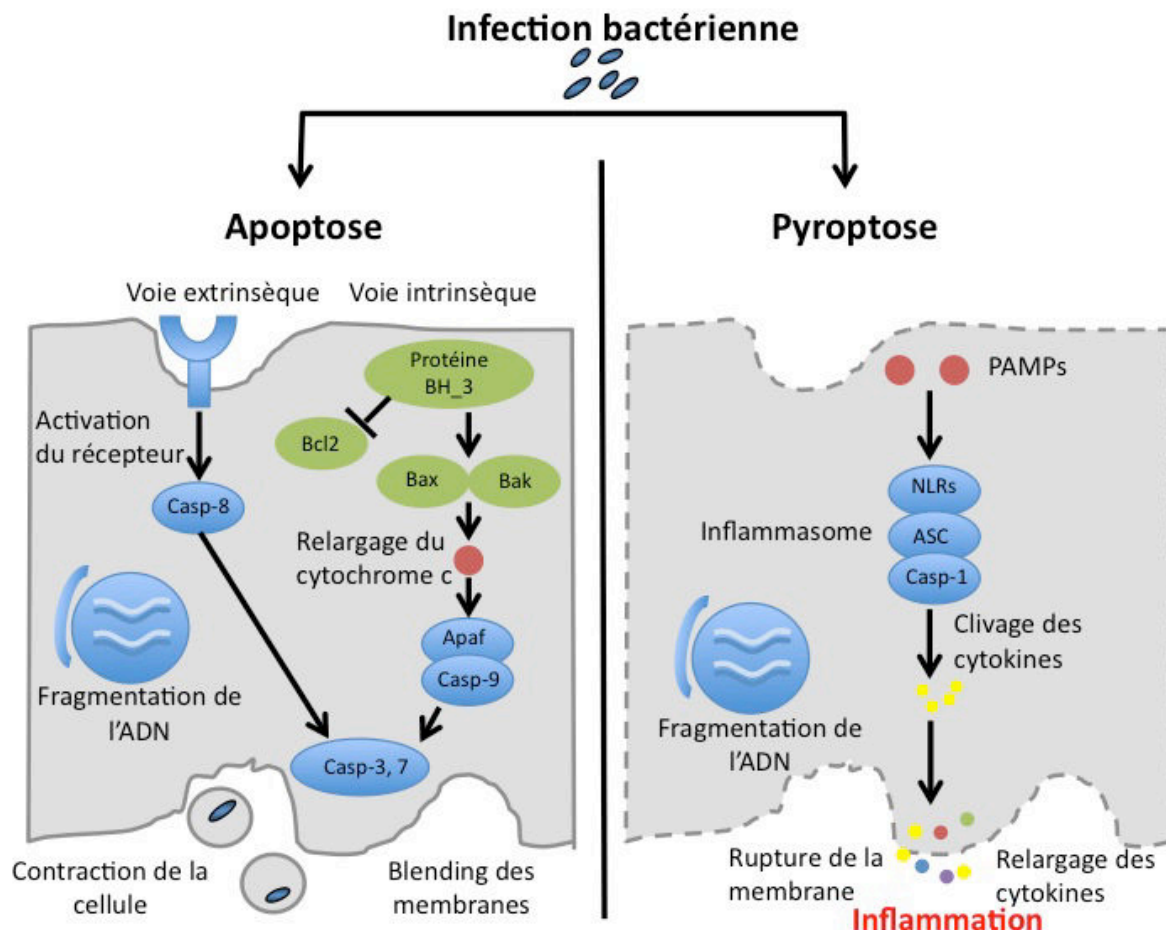
Les bactéries à multiplication intracellulaire, dans leur processus de parasitisme des fonctions de l'hôte, peuvent soit favoriser l'apoptose, soit l'inhiber. La favorisation de

l'apoptose permet une destruction sélective des cellules où a lieu l'infection et notamment des macrophages. Cette méthode est particulièrement utilisée par les bactéries comme *B. anthracis*, *C. diphtheriae* et *B. pertussis* (Sansonetti, 2000). A l'inverse, certaines bactéries inhibent l'apoptose afin d'assurer leur survie dans la cellule infectée. L'inhibition de l'apoptose, au niveau des macrophages, semble être en lien avec la capacité du LPS (lipopolysaccharide) des bactéries Gram négatif à activer le facteur transcriptionnel NFκB (Colotta et al., 1996).

Un autre mécanisme de mort cellulaire, dépendant de l'inflammation, peut être mis en place par le macrophage : la pyroptose (voir figure 11). Celui-ci est particulièrement utilisé dans le cas des pathogènes intracellulaires comme *F. tularensis*, *S. flexneri* et *L. pneumophila*, qui sont en mesure de s'échapper du phagosome. Les bactéries peuvent activer ce mécanisme de mort cellulaire eucaryote lorsque des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), sont reconnus comme étant présents à une localisation cellulaire anormale (Ashida et al., 2011). Dans le cytosol, les PAMPs sont reconnus par des PRRs (Pattern Recognition Receptors) cytoplasmiques, et notamment par des NLRs (Nucleotide oligomerization domain Like Receptor). Les NLRs sont une famille de PRRs cytoplasmiques, composée d'une vingtaine de protéines, dont le rôle est de détecter la présence de composants bactériens dans le cytoplasme. Cette famille de PRRs est composée de trois sous-familles : les NOD, les NALP et les NAID. A titre d'exemple, le NLRP3, qui est un capteur des dommages de la membrane cellulaire, est en mesure d'être activé lors de l'infection par *L. monocytogenes*, *Shigella*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamidia*. Autre exemple, le NLR AIM2 (Absence In Melanoma 2), qui reconnaît la présence d'ADN double brin dans le cytosol, est capable d'entraîner une lyse spontanée ainsi qu'une pyroptose des macrophages murins lors de l'infection par *F. tularensis* ou *L. monocytogenes* (Fernandes Alnemri et al., 2010; Jones et al., 2010; Rathinam et al., 2010; Tsuchiya et al., 2010). La détection cytosolique d'un PAMP par un NLR induit l'assemblage d'un complexe de protéines appelé inflammasome (Yilmaz et al., 2010). Ce complexe multiprotéique est composé du NLR activé, de la protéine ASC et de la caspase-1. Il permet l'activation de la caspase-1, une cystéine protéase qui entraîne à son tour l'activation de précurseurs de cytokines pro-IL-1β et proIL-18 (Thornberry et al., 1992). Ces deux cytokines pro-inflammatoires, libérées en extracellulaire, entraînent notamment l'activation de la réponse inflammatoire Th1 et Th17. L'inflammasome active en parallèle un programme de mort cellulaire appelée pyroptose (Ashida et al., 2011; Schroder and Tschopp, 2010). Ce processus permet donc, par la mort de la cellule phagocytaire, de briser la niche de

multiplication de la bactérie intracellulaire et de l'exposer à nouveau à l'élimination par les cellules de l'immunité et notamment les polynucléaires neutrophiles (Miao et al., 2010).

**Figure 11 :** Schéma récapitulatif de l'activation de la mort cellulaire par apoptose ou pyroptose lors de l'infection. Librement inspiré de (Ashida et al., 2011)



### 1.2.6 L'intoxication métallique

Les métaux font partie intégrante des besoins nutritionnels des bactéries. Ils sont particulièrement retrouvés au niveau du site actif des enzymes. Cependant, les concentrations intracytoplasmiques de ces métaux doivent être finement régulées. En effet, une forte concentration extracellulaire en zinc ou en cuivre est particulièrement bactéricide (Lemire et al., 2013). Par exemple, une concentration importante en zinc affecte la chaîne respiratoire des bactéries. Des études récentes ont mis en évidence l'utilisation de métaux de transition par les

macrophages dans le but de limiter la croissance des bactéries phagocytées (Soldati and Neyrolles, 2012). Deux transporteurs, localisés à la membrane du phagosome, ont été particulièrement mis en lumière : le transporteur de zinc ZNT1 et le transporteur de cuivre ATP7A (Trost et al., 2009). Une augmentation de la localisation phagosomale de ces transporteurs lors de l'activation des macrophages par l'INF $\gamma$  a aussi été décrite (Trost et al., 2009).

### 1.2.7 La restriction en nutriments

Un autre moyen de lutter contre les pathogènes est de limiter leur croissance en les privant de nutriments essentiels. Le fer est l'élément ayant été le plus étudié dans les interactions hôtes-pathogènes (Collins, 2003; Paradkar et al., 2008; Schaible and Kaufmann, 2004). En effet, le macrophage utilise plusieurs mécanismes afin de restreindre la disponibilité en fer au niveau du phagosome, privant ainsi la bactérie d'un nutriment essentiel à sa croissance.

Lors d'une infection intracellulaire et particulièrement sous l'action des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et INF $\gamma$ , le macrophage restreint son pool de fer libre dans le cytoplasme en modifiant ses flux intracellulaires (Paradkar et al., 2008). La synthèse de TfR (« Transferrine receptor »), qui assure l'importation du fer dans la cellule, diminue. A l'inverse, celle de la ferritine qui assure le stockage du fer, et de la ferroportine, qui permet l'export de fer, augmentent (Byrd and Horwitz, 1989; Nairz et al., 2007; Weiss, 2002; Zhong et al., 2001).

Au niveau du phagosome, le transporteur NRAMP1 (« natural resistance associated macrophage protein 1 ») joue un rôle dans le transport de fer. Les macrophages dont le gène codant pour NRAMP1 a été muté sont plus sensibles à l'infection par des bactéries intracellulaires (Skamene et al., 1998). Ce transporteur permettrait l'extrusion du fer présent dans la lumière des phagosomes afin d'en limiter l'accès aux bactéries phagocytées (Goswami et al., 2001). Le rôle exact de NRAMP1 ne semble pas tout à fait clair actuellement. Il jouerait aussi un rôle dans des flux de cations divalents tels que le manganèse et le cobalt. Son expression est de plus augmentée après activation des macrophages par l'INF $\gamma$  (Forbes and Gros, 2001; Jabado, 2000). Des doutes demeurent sur le sens du transport qu'il promeut. En effet, l'hypothèse d'un rôle non pas dans l'export mais dans l'import du fer dans le phagosome, dans le but d'intoxiquer les bactéries, a été posée (Zwilling et al., 1999).

## 2. La vie intramacrophagique de *Francisella tularensis*

La vie intra-macrophagique de *F. tularensis* constitue un modèle unique d'interaction avec la cellule hôte (voir figure 12). En effet, comme tous les parasites intracellulaires, *Francisella* a développé de nombreuses stratégies pour survivre et se multiplier dans un grand nombre de cellules de mammifères (Clemens and Horwitz, 2007; Horzempa et al., 2011) (Voir figure 12).

Cependant, la majorité des études concernant la compréhension des interactions entre les bactéries et les cellules phagocytaires a été réalisée à partir de cultures cellulaires de macrophages, MDM (macrophages dérivés de monocytes) et THP1 (lignée de monocytes humains issue de leucémie), qui sont les niches principales de la bactérie *in vivo* (McLendon et al., 2006). Ces études ont permis d'identifier les différentes étapes de l'infection de *Francisella*. De plus, un profil transcriptionnel de la souche SCHU S4 de *F. tularensis* subsp *tularensis* durant l'infection de macrophages murins de moelle osseuse a permis de mettre en évidence une régulation positive de 298 gènes et une régulation négative de 360 gènes durant l'infection (Wehrly et al., 2009). Ces modifications illustrent bien la réponse adaptative de la bactérie à l'infection intracellulaire.

### 2.1. Adhésion et internalisation

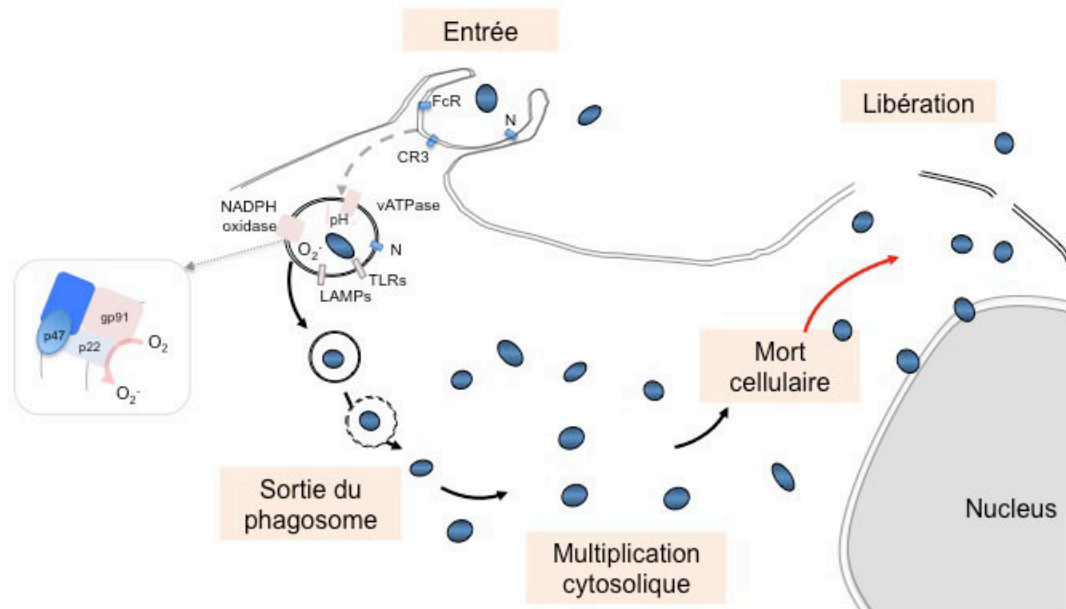
L'entrée de *Francisella* dans le macrophage est provoquée par le contact entre les déterminants bactériens (LPS, composant de capsule...) et les récepteurs du macrophage présents au niveau de sa membrane plasmique. L'entrée se fait via de larges boucles asymétriques de pseudopodes (Clemens et al., 2005). Ce processus d'internalisation est dépendant des microfilaments d'actine et diffère structurellement de tous les processus d'internalisation bactérien connus jusqu'à présent (Clemens and Horwitz, 2007; Tamilselvam and Daefler, 2008). En effet, le processus dit « zipper », utilisé par *L. monocytogenes* et *Y. pseudotuberculosis* se caractérise par une interaction forte entre les adhésines ou les opsonines présentes à la surface de la bactérie et les récepteurs présents à la membrane plasmique de la cellule. Cette interaction entraîne un réarrangement du cytosquelette permettant l'apparition de petits pseudopodes enserrant la bactérie (Hilbi, 2006). L'autre processus de pénétration connu, appelé « Trigger », est décrit chez *S. flexneri*, *S. typhimurium*

et *L. pneumophila*. C'est un mécanisme actif où la bactérie envoie un signal à la cellule entraînant un fort réarrangement du cytosquelette qui se traduit par la formation d'un « hérissément » de la membrane (Ireton and Cossart, 1997).

Tous les facteurs impliqués dans l'internalisation de *Francisella* ne sont pas actuellement complètement définis. On sait cependant qu'elle est facilitée par l'opsonisation de la bactérie par le facteur C3 du complément. En effet, l'interaction entre le facteur C3 présent à la surface des bactéries et les récepteurs CR3 et CR4 de la membrane phagosome permet la phagocytose (Clemens and Horwitz, 2007) (Voir figure 12). Ces récepteurs ne sont pas les seuls. Les récepteurs au fragment constant des immunoglobulines, à la nucléoline, les MR (Mannose Receptor), les SP-A (récepteur à la protéine A du surfactant des alvéoles pulmonaires) et les SR-A (Scavenger Receptor de classe A) sont aussi impliqués dans ce processus d'entrée (Balagopal et al., 2006; Barel et al., 2008; Clemens and Horwitz, 2007; Schulert and Allen, 2006). Malgré le rôle important de l'opsonisation pour l'entrée de *Francisella* dans le macrophage, il n'est actuellement pas exclu que des protéines effectrices, impliquées dans le réarrangement du cytosquelette et la pénétration de la bactérie, soient transloquées dans la cellule à l'aide de systèmes de sécrétion de type III ou IV, comme c'est le cas chez *S. typhimurium*, *S. flexneri* ou *L. pneumophila* (Hilbi, 2006). Au niveau enzymatique, la tyrosine kinase Syk semble impliquée. En effet, son inhibition entraîne une forte diminution de l'internalisation de *Francisella*. Une étude de 2008 (Tamilselvam and Daefler, 2008), semble indiquer un recrutement de domaines lipidiques riches en cholestérol et contenant de la calveoline-1, appelés « radeaux lipidiques », au niveau de la membrane plasmique de la cellule lors de l'infection par la souche LVS de *F. holarctica*.

Les bactéries internalisées dans de larges vacuoles vont se déplacer vers le centre du macrophage en quelques secondes à quelques minutes. Durant ce laps de temps, la taille du phagosome va baisser considérablement (Clemens et al., 2005).

**Figure 12 :** Détail de l'entrée et du contrôle du phagosome par *F. tularensis*. D'après (Barel and Charbit, 2013)



## 2.2. Contrôle du phagosome par *Francisella tularensis*

*Francisella* interfère avec le processus de phagocytose normal des macrophages et en particulier lors de trois étapes : la maturation du phagosome, l'acidification du phagosome et le burst oxydatif (voir figure 12 et 13).

### 2.2.1 Maturation du phagosome

Lors de l'infection d'un macrophage par *Francisella*, la maturation des phagosomes est incomplète. Celle-ci est interrompue après la fusion avec les endosomes tardifs (Clemens et al., 2004; Golovliov et al., 2003) et avant la fusion avec les lysosomes. Comme décrit précédemment, les vacuoles de phagocytose perdent rapidement leur grande taille et se transforment en « phagosomes contenant *Francisella* » (FCP), qui mûrissent en endosomes précoces (Clemens et al., 2004) puis en endosomes tardifs. La rupture de la membrane



phagosomale par un mécanisme inconnu à ce jour, permet la sortie de *Francisella* dans le cytoplasme et sa multiplication. Ces étapes peuvent être suivies par la visualisation de EEA-1 (Early Endosome Antigen 1), un marqueur spécifique de l'endosome précoce, puis par l'apparition de CD63, LAMP1, LAMP2 et Rab7 GTPase, marqueurs de l'endosome tardif, à la surface du phagosome. Ces derniers sont perdus rapidement après l'échappement de *Francisella* du phagosome (Santic et al., 2008). L'absence de fusion avec les lysosomes est observable car l'endosome tardif contenant *F. tularensis* ne présente pas de cathepsine D ni de marqueurs lysosomaux à sa surface.

Le processus de sortie a lieu entre la première et la quatrième heure d'infection (Checroum et al 2006, Clemens et Horwitz 2007, Santic et al 2005). L'échappement phagosomal est régulé par trois voies : la voie SHIP (inositol phosphatase), qui favorise la sortie ; l'induction de la voie FAS de l'apoptose (Rajaram et al., 2009) ; la voie PI3K/akt qui inhibe ce phénomène. D'après une étude de 2011 (Su et al., 2011), les gènes *capBCA* favorisent aussi la sortie du phagosome. A l'inverse, des recherches récentes ont permis de mettre en évidence que l'opsonisation de *Francisella*, via les récepteurs CR3 ou FCR, permet de diminuer l'échappement phagosomal (Knodler and Celli, 2011). Une étude de 2009 (Wehrly et al., 2009), présentant le profil transcriptionnel de *Francisella tularensis* durant la phase phagosomale, montre une forte augmentation de l'expression des gènes codants pour des protéines chaperonnes moléculaires (ClpB, GroEL, Hsp, ...), des gènes associés à la réponse au stress oxydatif (Méthionine sulfoxyde réductase, peroxydase, ...) et des gènes appartenant à l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI) (*pdpA*, *pdpB*, *dotU*, *iglI*, *pdpD* et *iglABCD*).

### 2.2.2 Acidification phagosomale

L'acidification du phagosome est un élément important de la lyse bactérienne par les macrophages. En effet, un pH phagosomal de 5,5 suffit pour détruire *Francisella* (Clemens et al., 2004). Afin de survivre, la bactérie a la capacité d'empêcher l'acidification du FCP et de le maintenir à un pH de 6,4, identique à celui du cytoplasme (Golovliov et al., 2003).

L'acidification étant un phénomène nécessaire à la maturation du phagosome ainsi qu'à l'activité optimale de certaines enzymes bactéricides, elle est donc à la fois une nécessité et une conséquence de la maturation du phagosome (Huynh and Grinstein, 2007). Cette acidification est la conséquence de l'activité des pompes ATPase vacuolaires (vATPase).

Différentes études sur la phase phagocytaire de *Francisella* (Bönquist et al., 2008; Clemens et al., 2004, 2009) ont permis de mettre en évidence à la fois une résistance des souches *F. tularensis* LVS et SCHU S4 à l'acidification du phagosome et une diminution de nombre de pompes ATPases à la membrane de FCP. Ces conclusions semblent mettre en avant une affectation de la maturation des phagosomes par *F. tularensis*. D'autres travaux ont mis en évidence une acidification et une acquisition des pompes vATPase par les phagosomes contenant *F. tularensis* ou *F. novicida* avant leur rupture, suggérant ainsi la nécessité d'une maturation du FCP avant la rupture phagosomale (Chong et al., 2008; Clemens and Horwitz, 2007). Ce serait donc le pH acide du FCP qui permettrait l'activation des facteurs responsables de la rupture phagocytaire, permettant ainsi la sortie de la bactérie dans le cytosol et sa multiplication.

Plusieurs gènes ont été identifiés comme jouant un rôle (direct ou indirect) sur le blocage de l'acidification du phagosome, tels les gènes *iglC* et *iglD* (présents dans l'îlot de pathogénicité FPI), ainsi que *mglA* codant pour l'activateur pleiotrope MglA (Bönquist et al., 2008). Les protéines correspondantes sont également impliquées dans la rupture de la membrane phagosomale. Cependant, d'autres gènes participent vraisemblablement à ce phénomène de blocage. En effet, l'inactivation de ces gènes n'entraîne une acidification que dans 40% des phagosomes de macrophages infectés. De plus, même en l'absence de synthèses protéiques, lorsque LVS est tuée par de la formamine par exemple, on observe une absence d'acidification dans la majorité des vacuoles contenant la souche LVS. De même, les LVS tuées par la formamine sont en mesure d'empêcher partiellement la fusion du phagosome avec le lysosome (Bönquist et al., 2008).

### 2.2.3 Inhibition du « burst oxydatif »

En réponse à l'interaction avec un pathogène, le macrophage induit l'activation de différentes voies de transduction du signal, conduisant à la production d'effecteurs antimicrobiens. Le phénomène de « burst oxydatif » ou « burst respiratoire » est l'un d'eux. Il consiste en la production rapide et localisée d'intermédiaires réactifs de l'oxygène ou de l'azote, tels le superoxyde, le peroxyde d'azote ou le monoxyde d'azote. Ces intermédiaires réactifs sont responsables de la mort bactérienne par peroxydation lipidique et oxygénation des protéines et des acides nucléiques. Deux enzymes sont responsables de ce « burst oxydatif » : la NADPH oxydase et la nitric oxide synthétase (NOS) (Rosenberger and Finlay,

2003). Afin de contrer l'effet délétère des ROS et des RNS, *Francisella* possède trois mécanismes de défense enzymatiques :

- **Le blocage de l'assemblage de la NADPH oxydase à la membrane phagosomale** : de nombreuses études, sur des espèces pathogènes diverses (*C. burnetii*, *B. pseudomallei* et *P. pseudomallei*), ont pu mettre en évidence le rôle critique des phosphatases acides dans la virulence et la pathogenèse bactérienne (Baca et al., 1993; Kondo et al., 1996; Markova et al., 1998). Chez *Francisella*, la phosphatase acide AcpA a été décrite comme possédant un rôle dans la régulation du burst oxydatif des cellules infectées. AcpA, située dans le périplasma bactérien et pouvant être libérée sous une forme soluble, empêche la formation de la NADPH oxydase par la déphosphorylation des composants p47phox et p40phox de l'enzyme. AcpA permet la survie lors de l'infection de neutrophiles, dans lesquels le burst oxydatif a été stimulé par FMet-Leu-Phe ou par du PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) (Baron, 1996). Un mutant du gène *acpA* chez *F. novicida* présente une mortalité accrue dans les macrophages humains THPI et un défaut de sortie des phagosomes de l'ordre de 75% (Mohapatra et al., 2007). Chez *F. novicida*, trois phosphatases acides ont été mises en évidence : A, B et phosphatase acide histidine Hap. La délétion de ces trois gènes provoque, chez *F. novicida*, une perte totale de la capacité d'échappement du phagosome, une incapacité à se multiplier dans les macrophages humains et murins ainsi qu'une perte de la virulence *in vivo* (Mohapatra et al., 2008).

- **Le blocage de la production de ROS** : les régulateurs de l'opéron *iglABCD*, MigR et FevR, ainsi que les gènes de la voie de biosynthèse des pyrimidines *carA*, *carB* et *pyrB*, encodant les petites et grandes sous-unités de la carbamoylphosphate synthase, ont été décrits comme contribuant au blocage de la NADPH oxydase (Buchan et al., 2009; McCaffrey and Allen, 2006; McCaffrey et al., 2010; Mohapatra et al., 2010; Schulert GS et al., 2009; Schulert et al., 2009).
- **La détoxification des ROS** : le blocage de la production des ROS n'étant pas total, *Francisella* a développé un dernier mécanisme de défense. Ce sont des enzymes de détoxification des dérivés oxygénés telles que la catalase KatG (Lindgren et al., 2007; Melillo et al., 2009), ou les superoxyde dismutases, SodB et SodC (Bakshi et al., 2006, 2008; Melillo et al., 2009).

Une étude récente chez *F. novicida* réalisée dans notre laboratoire, a permis de mettre en évidence le rôle déterminant du transporteur de glutamate GadC dans la résistance au stress oxydant (Ramond et al., 2013) (voir annexe 2). Un mutant dans le gène *gadC* possède un défaut de croissance important dans les macrophages de moelle osseuse de souris (BMM), défaut aboli dans le cadre de BMM de souris PHOX-KO dont le gène codant pour la NADPH oxydase est délété. Dans le cytoplasme bactérien, le glutamate peut être converti en de nombreux produits : de la glutamine, du glutathion, du GABA et des intermédiaires du cycle de Krebs. L'un de ces intermédiaires du cycle de Krebs, l'oxoglutarate, est connu comme un agent anti-oxydant. En effet, l'oxoglutarate se transforme naturellement en succinate lorsqu'il est en contact avec de l' $H_2O_2$ , neutralisant ainsi le stress oxydant. Par sa conversion en oxoglutarate, le glutamate, capté via le transporteur GadC, participe à la défense de la bactérie face au stress oxydant du phagosome eucaryote.

## 2.3. Destin intracellulaire de *Francisella tularensis*

### 2.3.1 Sortie du phagosome et multiplication intracytosolique

Après être sortie du phagosome, *Francisella* se trouve dans le cytosol où elle va se multiplier activement (temps de doublement variant entre 45 min et 90 min selon les sous-espèces, les types cellulaires et les milieux de culture utilisés) (voir figure 13). Le comportement intracellulaire des bactéries a été étudié, sur des souches virulentes et atténuées, dans différents types cellulaires : macrophages murins, humains, cellules hépatocytaires, macrophages primaires murins, ... (Checroun et al., 2006; Clemens et al., 2004; Golovliov et al., 2003; Santic et al., 2005; Schulert and Allen, 2006).

La diversité des souches bactériennes utilisées ainsi que la variété des cellules réceptrices a permis de générer un panel de données sur la vie intracellulaire de *Francisella*, qui contient, dans certains cas, des contradictions.

Lors de l'infection de macrophages murins de moelle osseuse par *F. tularensis*, la dégradation de la membrane phagocytaire débute dès 30 minutes, la moitié des bactéries se trouvent dans le cytosol en 1 heure et la totalité en 4 heures. Par la suite, la multiplication de *F. tularensis* dans le cytosol débute et atteint son maximum entre 8 heures et 12 heures post infection. Dans cet intervalle, le temps de doublement est estimé à 53 minutes. Ce temps de

doublement est différent selon les souches et les sous-espèces. Il est, par exemple, de 109 minutes pour la souche FSC200 de *F. tularensis* subsp *holarctica* et de 114 minutes pour la souche LVS. Cette multiplication plus rapide de la sous-espèce de type A semble indiquer une meilleure adaptation à la vie intracellulaire.

Durant cette étape de multiplication, il a été observé lors de l'infection de BMM par la souche SCHU S4 de *F. tularensis* subsp *tularensis*, un regroupement de cellules bactériennes dans de grandes vacuoles multi-membranaires juxta-nucléaires, appelées vacuoles contenant *Francisella* (VCF) (Checroun et al., 2006). Ces vacuoles, composées d'une double membrane, possèdent à leur surface le marqueur LAMP-1 et contiennent la protéine LC-3 spécifique de l'autophagie. La confirmation du rôle de l'autophagie dans la genèse de ces membranes a été effectuée par la mise en évidence de l'inhibition de leur formation par la 3-méthyl adénine (Checroun et al., 2006; Wehrly et al., 2009). Cependant, ces résultats n'ont pu être confirmés par des observations similaires dans d'autres types cellulaires ou avec d'autres sous-espèces de *F. tularensis*. L'hypothèse d'un rôle des VCF dans l'accession de *F. tularensis* à la machinerie du trafic membranaire, facilitant ainsi sa sortie dans le milieu extracellulaire par exocytose, a été émise.

*F. tularensis* est en mesure de lutter contre l'autophagie, l'une des défenses de la cellule contre les bactéries à multiplication intracellulaire. En effet, seuls des mutants incapables de se répliquer dans le cytosol ou étant déficients pour la synthèse de l'antigène-O de capsule ont été observés comme étant éliminés par un processus d'autophagie classique (Case et al., 2014; Chong et al., 2012).

Plusieurs gènes impliqués dans la réplication cytosolique de *F. tularensis*, comme par exemple le gène *iglD* présent dans le FPI (Santic et al., 2007). De façon intéressante, la co-infection de mutant dans le gène *iglD* et de souche sauvage de *F. tularensis* entraîne un retour de la multiplication cytosolique des mutants. Cette étude suggère donc une implication de la protéine IglD dans la formation d'un environnement cytosolique favorable à la multiplication de la bactérie.

### 2.3.2 Adaptations métaboliques et nutritionnelles lors de la phase cytosolique

La nutrition revêt un aspect essentiel dans la multiplication intracellulaire de *Francisella*. En effet, des mutations dans les systèmes de transport de nutriments, ainsi que dans les voies

métaboliques bactériennes, entraînent une perte de l'adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte et de forts défauts de croissance. Des travaux sur l'importance de la voie de biosynthèse des purines ont mis en évidence l'importance des gènes *purMCD* pour la multiplication cytosolique (Pechous et al., 2006). Au niveau des systèmes d'acquisition de nutriments nécessaires à la multiplication bactérienne, peu de données sont disponibles chez *Francisella*. Nous pouvons cependant citer la mise en évidence de la capture des peptides intracellulaires contenant de la cystéine et notamment le glutathion, comme source de cystéine pour la souche LVS de *F. tularensis* (Alkhuder et al., 2009). En effet, le glutathion, qui est le tripeptide contenant de la cystéine le plus abondant dans les cellules de mammifères (Franco et al., 2007; Griffith, 1999; Wu et al., 2004), a été mis en évidence comme étant essentiel à la multiplication cytosolique de la souche LVS de *F. tularensis*. Son utilisation passe par une enzyme, la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase, qui clive la liaison entre le glutamate et le dipeptide cystéine-glycine du glutathion (Alkhuder et al., 2009) permettant (après clivage par une aminopeptidase) la libération de glycine et de cystéine.

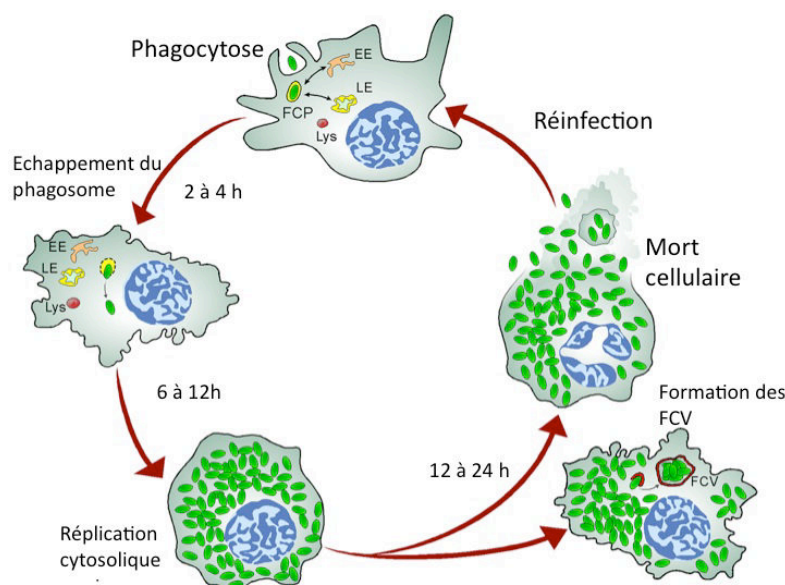
### 2.3.3 Déclenchement de la mort cellulaire de l'hôte et sortie de la cellule

*F. tularensis* est en mesure d'initier la mort cellulaire de son hôte par deux mécanismes distincts : l'apoptose et la pyroptose. Cette mort cellulaire permet la libération des bactéries dans le milieu extérieur et leur dissémination (voir figure 13).

Les signalisations nécessaires au mécanisme de mort cellulaire par apoptose, observées notamment dans les macrophages, sont déclenchées par le grand nombre de bactéries retrouvées dans le cytosol. L'observation de la sortie de *Francisella*, conséquence de l'apoptose du macrophage, a lieu environ 18h post infection. Cette sortie correspond au moment où, au vu du grand nombre de bactéries par cellule, les nutriments cytoplasmiques deviennent rares (Lai et al., 2001). L'initiation de l'apoptose dans les macrophages est, elle, plus précoce. En effet, elle débute entre 9h et 12h après infection. Cette activation, qui semble similaire à la voie intrinsèque de l'apoptose, passe par le relargage du cytochrome C des mitochondries, entraînant le changement du potentiel de membrane mitochondrial. Cette libération déclenche la formation du complexe apoptotique, l'activation des caspases pro-apoptotiques 3, 8 et 9 et la libération des bactéries par apoptose (Lai and Sjøstedt, 2003; Pierini et al., 2012).

*F. tularensis* est aussi en mesure de déclencher une mort cellulaire inflammatoire par pyroptose. En effet, le récepteur AIM2, qui détecte la présence d'ADN double brin bactérien dans le cytoplasme, entraîne l'activation de l'inflammasome lors de l'infection par *Francisella* (Fernandes Alnemri et al., 2010; Jones et al., 2012; Rathinam et al., 2010). Cette activation de l'inflammasome conduit à la lyse de la procaspase-1 en caspase-1 et à l'enclenchement de la pyroptose (Mariathasen et al., 2005; Weiss et al., 2007).

**Figure 13 :** Cycle de réplication de *Francisella tularensis* dans les macrophages. D'après (Chong and Celli, 2010)



### 3. Bases moléculaires de la virulence de *Francisella tularensis*

Différentes approches ont été utilisées afin d'expliquer la capacité de *F. tularensis* à se multiplier dans de nombreuses cellules de mammifères, et notamment dans les cellules immunitaires (Anthony et al., 1991). Dans un premiers temps, le séquençage du génome de *Francisella*, ainsi que des études génomiques et protéomiques, ont permis de mettre en avant certains indices concernant ses capacités d'infection (Larsson et al., 2005). Dans un second temps, des expériences de mutagénèses dirigées et aléatoires ont permis d'identifier certains gènes essentiels à la croissance intracellulaire (Meibom and Charbit, 2010; Pechous et al., 2009). Cependant, le rôle d'un grand nombre des protéines codées par ces gènes reste inconnu à ce jour.

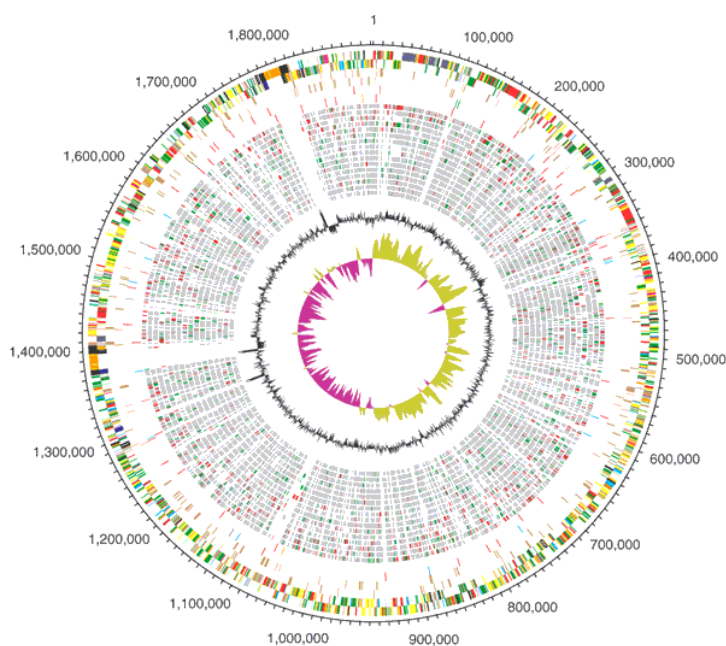


Dans cette partie, j'expliciterai le rôle dans l'infection des principaux facteurs de virulence de *F. tularensis* : le génome, le lipopolysaccharide, la capsule, le système d'acquisition du fer, l'îlot de pathogénicité de *Francisella* et les systèmes de sécrétion.

### 3.1. Le Génome

Le génome de la souche la plus virulente de *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, possède un chromosome circulaire d'une taille de 1.892.819 paires de bases (voir figure 14). Son annotation a permis d'indiquer qu'il était constitué de 1.804 gènes et de 201 pseudogènes, soit environ 11% des séquences codantes. Actuellement, plus de 20% des gènes de *F. tularensis* demeurent de fonction inconnue.

**Figure 14 :** Carte circulaire du génome de *F. tularensis* subsp. *tularensis* souche SCHU S4. D'après (Larsson et al., 2005)



Les pseudogènes retrouvés dans les génomes des espèces *F. tularensis* pathogènes sont dûs, pour la plupart, à des mutations de type insertion/délétion et substitution. Une grande proportion de ces pseudogènes code pour des fonctions dans le transport, la synthèse des acides aminés ou le métabolisme de l'ADN. Cette présence importante de pseudogènes dans les voies métaboliques de *F. tularensis* est la cause des nombreuses exigences nutritionnelles de celle-ci (Larsson et al., 2005). Il est intéressant de noter que le nombre de pseudogènes retrouvé dans les génomes de *F. tularensis* ssp. *novicida* est très largement inférieur à celui des



autres sous-espèces (14 pseudogènes seulement). Cette observation met en avant l'adaptation de cette bactérie au milieu extérieur et donc à des conditions nutritionnelles plus variables. A l'inverse, les espèces plus pathogènes présentent une adaptation métabolique spécifique aux nutriments présents chez l'hôte infecté.

La composition en G+C du chromosome de *F. tularensis* est de 32,25%, ce qui est classique des petits génomes bactériens. Il est intéressant de noter que l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI), dupliqué chez toutes les sous-espèces, sauf *novicida*, présente un pourcentage en G+C inférieur à celui du reste du génome (27,5%). Cette observation suggère un transfert horizontal de ce FPI d'une autre bactérie vers *Francisella*.

L'étude génomique du chromosome de *F. tularensis* a permis d'identifier deux principales séquences d'insertion : ISFtu1 et ISFtu2. Chez la souche SCHU S4, elles sont présentes à hauteur de 53 copies pour ISFtu1 et de 16 copies pour ISFtu2. L'étude de leur localisation génomique a permis de suggérer leur implication dans la plupart des réarrangements chromosomiques. En effet, elles sont particulièrement observées au niveau de points de rupture chromosomique. Tout comme les pseudogènes, les séquences d'insertion sont particulièrement retrouvées dans les sous-espèces de *F. tularensis* pathogènes pour l'Homme. La souche U112 ne contient qu'une séquence d'ISFtu1 quand la souche SCHU S4 en contient 53 (Champion et al., 2009; Rohmer et al., 2007). La présence d'autres séquences d'insertion, ISFU3, 4, 5 et 6 en plus petit nombre est également notable (Champion et al., 2009).

Les différentes sous-espèces de *F. tularensis* sont génétiquement très proches. En effet, leur pourcentage d'identité est supérieur à 98%. Il existe cependant des régions de différences génomiques entre ces sous-espèces, appelées « Regional Differences » ou RD. Ces régions sont au nombre de 22 et ont été mises pour la première fois en évidence (RD 1 à 8) en 2003 via l'analyse du génome entier par des puces à ADN (Broekhuijsen et al., 2003). Ces régions de différences ont été décrites comme absentes chez *F. tularensis* subsp *holarctica*. Par la suite, l'analyse par PCR du génome de 45 isolats de *F. tularensis* a permis de mettre en évidence les régions RD 9 à 22. RD1, décrite comme hautement variable d'une sous-espèce à une autre, permet une discrimination par analyse de la taille de l'amplicon. RD6, contenant le gène *pdpD* impliqué dans la virulence de *Francisella*, n'est pas présent chez la souche LVS. RD19 contient les gènes codants pour un pili de type IV.

De ces observations, plusieurs analyses de l'évolution des sous-espèces de *F. tularensis* ont été réalisées. Selon elles, les sous-espèces *tularensis* et *mediasitica* semblent les plus proches et la sous-espèce *holarctica* viendrait ensuite (Broekhuijsen et al., 2003; Svensson et al.,

2005). Une autre analyse présente les sous-espèces *tularensis* et *novicida* comme deux espèces différentes ayant évolué en deux populations distinctes (Larsson et al., 2005).

Longtemps restée inconnue, l'origine de l'atténuation de la souche LVS de *F. holarctica* a été plus finement étudiée. Ces recherches ont permis de mettre en évidence des variations de séquences susceptibles d'altérer la fonction de 35 gènes. Parmi eux, 7 gènes semblent être particulièrement responsables de l'atténuation de la souche. Il s'agit de 3 gènes codant pour des protéines hypothétiques (*FTL\_0168*, *FTL\_0439* et *FTL\_1773*) et de 4 gènes codant pour : la protéine PilA, une fumaryl acétoacétate hydrolase, une 3-oxoacyl-synthase III et une glycosyltransférase (Rohmer et al., 2007).

### 3.2. Le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide, ou LPS, est un composant majeur de la surface externe des bactéries à Gram négatif. Il est composé de trois entités synthétisées séparément : le lipide A, enchâssé dans la membrane externe, le noyau (ou « core »), sa partie médiane et l'antigène O, sa partie libre dans le milieu extérieur (voir figure 15) . Le LPS, capable d'activer les macrophages via le récepteur TLR4, fait partie des PAMPS (Akira and Takeda, 2004).

Contrairement au LPS de *E. coli*, celui de *F. tularensis* présente une bioactivité faible (Vinogradov and Perry, 2004). En effet, à l'inverse des LPS d'autres bactéries à Gram négatif, il n'est pas capable d'activer les macrophages via leur récepteur TLR4. L'activation de la production, par des macrophages murins, d'IL-1 et de TNF $\alpha$ , suite à une activation par le LPS de *E. coli*, est 1 000 fois supérieure à celle observée avec le LPS de *Francisella* (Ancuta et al., 1996; Hajjar et al., 2006; Sandstrom et al., 1992; Telepnev et al., 2003).

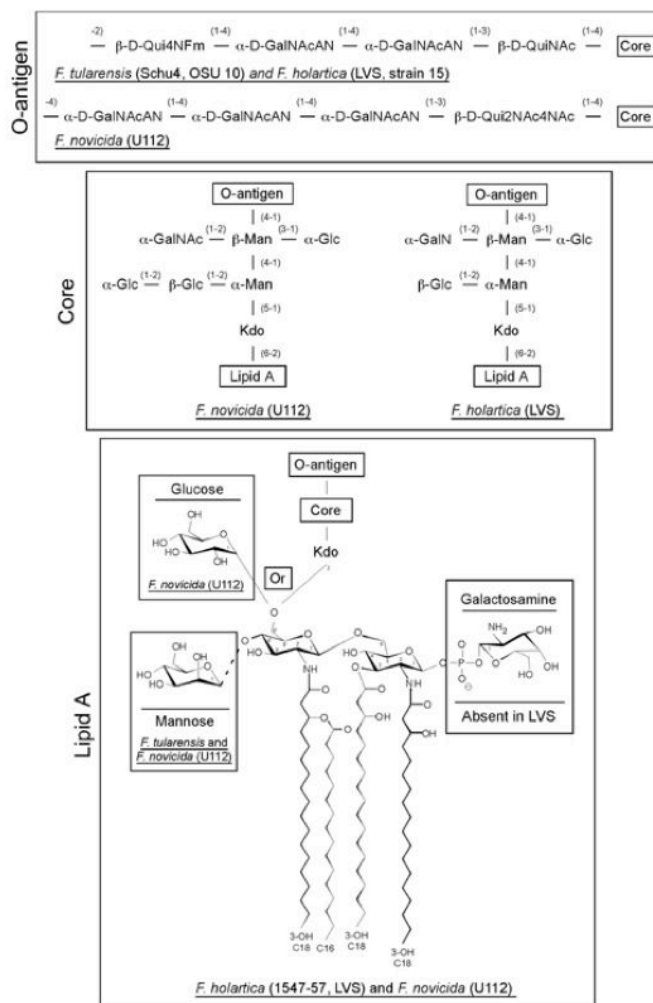
La base lipide A du LPS a été identifiée comme identique chez toutes les sous-espèces de *F. tularensis* (Gunn and Ernst, 2007). Cependant, le dimère de glucosamine du lipide A connaît des différences de glycosylation selon les sous-espèces.

De même, la structure du core du LPS possède une ossature commune chez les sous-espèces *holarctica* et *novicida*, tout en différent par la présence ou non de résidus glucose et mannose (Gunn and Ernst, 2007).

Les antigènes O des sous-espèces *tularensis* et *holarctica* sont identiques contrairement à celui de la sous-espèce *novicida* (Prior et al., 2003; Thirumalapura et al., 2005; Vinogradov and Perry, 2004). Cela explique les rôles différents joués par le LPS chez les différentes sous-espèces de *Francisella*. Pour les sous-espèces *novicida* et *holarctica*, le LPS a été mis en

évidence comme jouant un rôle dans la survie intracellulaire et *in vivo* chez la souris (Hartley et al., 2006; Li et al., 2007; Thomas et al., 2007). Dans la sous-espèce *novicida*, le LPS est aussi impliqué contre l'effet bactéricide du sérum.

**Figure 15 :** Structure du LPS des différentes sous-espèces de *F. tularensis* d'après (Gunn and Ernst, 2007)



### 3.3. La capsule

La capsule est l'un des attributs déterminants de la virulence de nombreuses bactéries pathogènes. Elle se présente sous la forme d'une barrière protectrice, située à l'extérieur de la paroi bactérienne, et qui participe notamment à la résistance à l'effet bactéricide du sérum.

Celle-ci peut être de nature peptidique (Candela and Fouet, 2005, 2006) ou, le plus souvent, polysaccharidique.

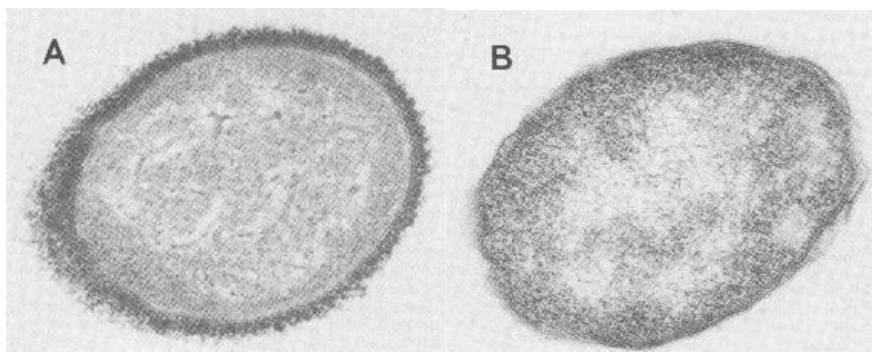
La présence d'une capsule polysaccharidique chez *F. tularensis* a longtemps été débattue. Cependant, celle-ci est actuellement communément acceptée (Golovliov et al., 2003; Sandstrom et al., 1988; Sorokin et al., 1996) (voir figure 16).

La création de souches acapsulées a permis de mettre en évidence une sensibilité accrue de *Francisella* à la destruction par la voie du complément (Sandstrom et al., 1988). L'importance de la capsule dans la virulence *in vivo* a aussi été mise en évidence. En effet, l'augmentation de la taille de la capsule d'une souche LVS par passages successifs en milieu Chamberlain est associée à une augmentation de la virulence chez les souris (Cherwonogrodzky et al., 1994). Plus récemment, des études utilisant des anticorps monoclonaux contre différents éléments de la capsule de *Francisella* purifiée ont permis de caractériser certains aspects de sa structure (Apicella et al., 2010). Ces travaux, chez *F. tularensis* et *F. holarctica*, ont permis de mettre en évidence une capsule d'une taille variant entre 100 et 250 kb (Apicella et al., 2010). De plus, l'immunisation de souris par des fragments de capsule purifiés, entraîne une protection efficace contre l'infection par la souche LVS mais pas par la souche SCHU S4 (Apicella et al., 2010; Jones et al., 2014).

La capsule de *F. tularensis* est composée d'un « cœur » similaire à l'antigène O du LPS, contenant une répétition de trois sucres : le 2-acetamido-2,6-dideoxy-o-glucose, le 4,6-dideoxy-4-formamido-D-glucose et le 2-acetamin-2-desoxy-o-galacturnoamide (Apicella et al., 2010; Jones et al., 2012). De récentes études ont permis de mettre en évidence une voie commune de biosynthèse de la capsule et du LPS chez *Francisella* (Jones et al., 2014). En effet, la mutation de gènes prédits comme étant responsables de la biosynthèse de la capsule a entraîné à la fois une interruption de la production de la capsule et du LPS.

D'autres résultats, obtenus après culture de *Francisella* sur milieu BHI, ont mis en évidence une capsule ne contenant pas l'antigène O (Zarrella et al., 2011). Cette capsule, composée de glucose, de galactose et de mannose, a aussi été mise en évidence chez des mutants *wbtA*, incapables de produire l'antigène O (Bandara et al., 2011).

**Figure 16 :** Souche sauvage capsulée de *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS (A) et souche non capsulée Cap<sup>-</sup> (B). Microscopie électronique, x 60 000. D'après (Sandström et al., 1988).



### 3.4. Acquisition du fer

Le fer est un élément essentiel à la croissance des êtres vivants. En effet, son utilisation par les cellules, notamment au niveau du site catalytique des enzymes est primordiale. Chez la bactérie, une carence en fer provoque un effet bactériostatique, et une absence de fer un effet bactéricide. Afin de survivre, les bactéries ont donc la nécessité de capter du fer dans le milieu extérieur. Dans les tissus animaux, la concentration en fer libre est extrêmement faible. *Francisella tularensis*, comme de nombreuses bactéries pathogènes, a donc développé des systèmes d'acquisition et de stockage du fer. Face à cette nécessité de la capture de fer par les bactéries, les cellules et notamment les macrophages, ont mis en place des systèmes de séquestration du fer. Les résultats de plusieurs travaux ont démontré que l'activation des macrophages, par reconnaissance du LPS ou stimulation par l'INF- $\gamma$ , entraînait une diminution de l'expression du récepteur à la transferrine (TfR), qui permet l'entrée de la transferrine dans la cellule, ainsi qu'une augmentation de la production de ferritine, qui permet la séquestration du fer dans le cytoplasme (Jones et al., 2012). Ces deux processus visent à limiter l'accès au fer libre dans le cytoplasme pour les bactéries intracellulaires. De façon étonnante, dans le cadre de l'infection par la souche LVS, l'expression de TfR est augmentée de manière significative et notamment au niveau des FCP. De plus, contrairement à un macrophage activé par reconnaissance du LPS ou stimulation par l'INF- $\gamma$ , un macrophage infecté par la souche LVS n'induit pas de production de ferritine. La souche LVS met donc en place, lors de l'infection de macrophages, un système de lutte actif contre la

séquestration du fer (Jones et al., 2012). Un autre mécanisme de défense eucaryote, visant à limiter l'accès au fer intracytosolique, est l'augmentation de l'expression de la ferroportine, qui permet l'export du fer. Afin de lutter contre cette séquestration, l'infection par LVS induit, par un mécanisme inconnu à ce jour, la production d'hepcidine, un peptide antimicrobien sécrété par les cellules hépatiques. L'internalisation et la dégradation de ce peptide conduit à l'inhibition de l'export de fer par la cellule (Jones et al., 2012).

Deux systèmes d'acquisition du fer ont, de plus, été identifiés chez *F. tularensis* : un système de production de sidérophore et de capture, appelé *fsl* (Ramakrishnan et al., 2008), et un système de transport putatif du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), encodé par les gènes *feoA* et *feoB* (Thomas-Charles et al., 2013). Cinq gènes, *fslABCDE*, font partie de l'opéron *fsl*. Trois d'entre eux, *fslA*, *fslB* et *fslC* ont été décrits comme étant essentiels à la sécrétion de sidérophores par *F. tularensis* (Sen et al., 2010). Le gène *fslE* assure la production du récepteur pour les sidérophores et les protéines FslB et D sont des transporteurs de la sous-famille MFS (Major Facilitator Superfamily), impliquées dans l'entrée des sidérophores. Des mutants dans ces mécanismes d'acquisition du fer sont décrits comme atténués dans leur croissance intracellulaire et dans leur virulence *in vivo* (Deng et al., 2006; Su et al., 2007; Weiss et al., 2007). Les gènes du transport du fer chez *Francisella* ont été particulièrement mis en évidence comme étant induits durant la phase de multiplication cytosolique (Wehrly et al., 2009). Le régulateur de la capture du fer (Fur), présent chez de nombreuses bactéries pathogènes, a été prédit par une analyse bio-informatique dans le génome de la souche SCHU S4, tout comme les gènes, *ftnA*, *fumB*, *acnA* et *sodB* décrits comme associés au transport du fer chez *L. pneumophila* (Larsson et al., 2005). Plus de 80 gènes ont été identifiés comme étant régulés (positivement ou négativement) par une carence en fer (Deng et al., 2006).

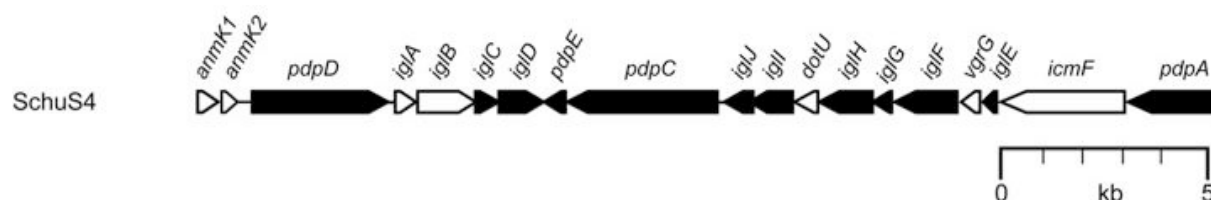
### 3.5. L'îlot de pathogénicité de *Francisella*

#### 3.5.1 Découverte et constitution

En 2004, Nano et al. ont mis en évidence par mutagenèse dirigée 2 locus : *iglA* et *iglC* (Nano et al., 2004). Ces locus, présents au sein de l'opéron *iglABCD* (pour intramacrophage growth locus ABCD), ont été identifiés comme nécessaires à la croissance dans les macrophages (Gray et al., 2002). Par la suite, des analyses bio-informatiques ont permis de

mettre en évidence l'existence, dans cette région, d'un îlot de pathogénicité d'une taille de 33,9 kb et constitué de 25 gènes, baptisé FPI pour « *Francisella pathogenicity island* » (voir figure 17). Ce FPI présente un pourcentage en G+C significativement différent du reste du génome de *Francisella* et est flanqué d'éléments de transposition (Barker and Klose, 2007; Nano et al., 2004).

**Figure 17 :** Ilot de pathogénicité de *Francisella tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4. D'après (Broms et al., 2010). Les flèches de couleur noire indiquent les gènes ne possédant pas d'homologie avec d'autres gènes bactériens. Les flèches blanches indiquent les gènes présentant des homologies significatives avec des gènes d'autres systèmes bactériens.



L'îlot de pathogénicité, bien que très conservé d'une espèce à une autre, est dupliqué chez toutes les sous-espèces de *F. tularensis* à l'exception de la sous-espèce *novicida*. Cette présence du FPI en simple copie pourrait être à l'origine de la moindre pathogénicité de cette sous-espèce chez l'Homme (Titball and Petrosino, 2007). Des études ont permis de formuler l'hypothèse d'une présence du FPI en simple copie dans le génome ancestral de *Francisella tularensis* (Larsson et al., 2009). La duplication serait due à l'insertion de copies de l'élément d'insertion ISFtul en amont et en aval du FPI, permettant une recombinaison non réciproque. Cette duplication chez les sous-espèces de *F. tularensis*, à l'exception de la sous-espèce *novicida*, explique en partie que les mutagénèses aléatoires dans les souches de *F. tularensis* LVS ou SCHU S4 ne parviennent que peu fréquemment à identifier des gènes de virulence associés au FPI (Kawula et al., 2004; Qin and Mann, 2006). L'identification plus fine des gènes impliqués dans la virulence associée au FPI n'a donc pu se réaliser qu'à partir des études sur la sous-espèce *novicida* (Gray et al., 2002; Tempel et al., 2006).

Le FPI est constitué de deux opérons contenant au total 17 gènes. Le premier est constitué de 5 phases ouvertes de lecture (ORF en anglais) : *pdpD*, *iglA*, *iglB*, *iglC* et *iglD* ; codant les protéines Igl.

Le second, orienté en sens inverse, code pour 12 gènes et contient notamment *pdpABC* « *pathogenicity determinant protein ABC* » ( *pdpA*, *pdpB*, *iglE*, *vgrG*, *iglF*, *iglG*, *iglH*, *dotU*, *iglI*, *iglJ* et *pdpC*) (Barker and Klose, 2007). La majorité du FPI est conservée chez les différentes sous-espèces à l'exception de la région amont de *iglA*, qui contient les gènes *anmK* et *pdpD*. Celle-ci varie entre les souches américaines de *Francisella* et les souches européennes (Ludu et al., 2008; Nano and Schmerk, 2007; Nano et al., 2004). Chez la sous-espèce *novicida*, les copies de ces deux gènes sont intactes. Chez la souche SCHU S4, le gène *anmK* est séparé en 3 ORF distinctes et le gène *pdpD* possède une troncature de 150 pb. Chez les souches OSU18 et LVS, le gène *anmK* et la plus grande partie du gène *pdpD* sont absents (Nano and Schmerk, 2007; Nano et al., 2004). L'étude de ces deux gènes chez *novicida* a permis de mettre en évidence une atténuation des mutants de délétion dans le gène *pdpD* lors d'infections d'embryons de poulets et de souris, sans perte de virulence dans les macrophages (Ludu et al., 2008), ainsi qu'un effet minimal de la délétion de *anmK* sur la virulence dans les embryons de poulet.

**Les gènes *igl*.** Les gènes de l'opéron *igl* encodent quatre protéines : IglA, IglB, IglC et IglD. Leur rôle dans la croissance intracellulaire de *Francisella* a été mis en évidence chez les sous-espèces *novicida* (de Bruin et al., 2007; Deng et al., 2006; Gray et al., 2002; Lauriano et al., 2004; Ludu et al., 2008; Santic et al., 2005a), *holarctica* (Bonquist et al., 2008; Golovliov et al., 1997, 2003; Lindgren et al., 2004) et *tularensis* (Twine et al., 2005). Les protéines IglA et IglC ont été décrites comme importantes pour la croissance dans les macrophages péritonéaux de souris (Gray et al., 2002). La protéine IglA est produite au cours de l'infection de macrophages et semble, de par ses caractéristiques biochimiques, être une protéine cytoplasmique interagissant avec IglB (de Bruin et al., 2007). La protéine IglC a été la plus étudiée de l'opéron *igl* et particulièrement chez la sous-espèce *novicida* via des approches *in vitro* et *in vivo* (Golovliov et al., 2003; Santic et al., 2005a; Twine et al., 2005). Son importance dans la croissance intracellulaire a notamment été mise en évidence chez l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (Lauriano et al., 2004). Chez la sous-espèce *holarctica*, la délétion des deux copies d'*iglC* provoque un défaut de croissance intramacrophagique, ainsi qu'une atténuation totale chez la souris. Le mécanisme d'action de la protéine IglC commence à être connu. Elle est produite par *Francisella* dès son entrée dans le macrophage et est nécessaire à la sortie du phagosome. En effet, dans les macrophages péritonéaux de souris, on retrouve 99% des mutants dans le gène *iglC* au niveau de la vacuole phagosomale (Golovliov et al., 2003). Ces mutants sont par la suite éliminés par maturation du phagosome en lysosome.



L'action d'IglC passe par une inhibition des voies NF- $\kappa$ B et MAP kinases conduisant à une faible production de TNF $\alpha$  et d'IL-1 et une atténuation de la réponse inflammatoire dans les macrophages infectés (Telepnev et al., 2005). La protéine IglD semble posséder, dans la sous-espèce *novicida*, un rôle dans l'échappement du phagosome. En effet, un mutant dans le gène *iglD* s'échappe plus rapidement du phagosome vers le cytosol de cellules pulmonaires et hMDMs de souris BALB/c, mais ne peut s'y répliquer (Santic et al., 2007). Pour terminer, le gène *iglE*, requis pour la croissance intramacrophagique de *Francisella*, code pour une lipoprotéine putative.

**Les gènes *pdp*.** L'importance des gènes *pdp* du FPI dans la virulence et la pathogénicité de *Francisella* a été mise en évidence chez la sous-espèce *novicida* par l'étude *in vitro* et *in vivo* de mutants des gènes *pdpA*, *pdpD* (Ludu et al., 2008; Mariathasen et al., 2005; Nano et al., 2004) et *pdpB* (Brotcke et al., 2006; Tempel et al., 2006). Une mutation dans le gène *pdpD* de *novicida* entraîne un défaut de croissance intracellulaire dans les macrophages de moelle osseuse et de virulence chez la souris (Nano et al., 2004). Ces résultats sont cependant à confirmer car la présence d'un effet polaire sur la transcription des gènes *iglABCD* lors de la mutation de *pdpD* pourrait modifier le phénotype observé (Nano and Schmerk, 2007). Une étude de 2008 suggère que l'expression du gène *pdpD* est en lien avec celle des gènes *iglA*, *iglB* et *iglC* (Ludu et al., 2008). En effet, une augmentation de la production de PdpD induit une augmentation de la synthèse de ces protéines. Cette étude a émis l'hypothèse d'un lien entre les protéines IglA, IglB et pdpB et un système de sécrétion permettant le passage des protéines PdpD et IglC vers la membrane externe. Un mutant dans le gène *pdpA* est incapable de s'échapper du phagosome des macrophages C57BL/6 (Mariathasen et al., 2005; Nano et al., 2004) et reste associé au marqueur lysosomal Lamp-1. Ces résultats suggèrent un effet de la protéine PdpA, identifiée comme une protéine soluble induite dans des conditions de carence en fer, dans la maturation du phagosome précoce jusqu'au stade tardif (Schmerk et al., 2009). Le gène *pdpB* est, lui, impliqué dans l'entrée et la croissance dans les macrophages murins J774 (Tempel et al., 2006). Une mutation dans ce gène entraîne une diminution de l'ordre d'un million de fois de la virulence chez les souris BALB/c.

**Et les autres...** Plus récemment, d'autres gènes du FPI ont été étudiés. Les gènes *iglG* et *iglI* semblent impliqués dans l'échappement du phagosome, l'activation de l'inflammasome et la virulence chez la souris (Broms et al., 2011). Des mutants dans les gènes *vgrG* et *dotU* ne peuvent plus s'échapper du phagosome, ne peuvent activer l'inflammasome et sont atténués chez la souris (Broms et al., 2012). Le gène *iglH* semble quant à lui, être nécessaire à la sortie

du phagosome ainsi qu'à la croissance intracellulaire (Straskova et al., 2012). Un mutant de ce gène est totalement avirulent chez la souris.

### 3.5.2 Un système de sécrétion de type VI ?

L'analyse bio-informatique des différents gènes du FPI a mis en évidence une homologie avec des gènes du système de sécrétion de type VI (SST6), mis en évidence dans le génome d'autres bactéries pathogènes (Barker and Klose, 2007; Nano and Schmerk, 2007; Nano et al., 2004). De façon identique au FPI, chez *V. cholerae* et chez *P. aeruginosa*, le SST6 est encodé par un ensemble de gènes conservés et regroupés dans un locus (Pukatzki et al., 2009).

9 gènes du FPI ont été identifiés comme ayant des homologues dans le SST6 : *pdpB* (homologue de *icmF*), *iglA*, *iglB*, *iglC*, *iglD*, *vgrG*, *iglF* (homologue de *clpV*), *pdpE* (*hcp*) et *dotU*.

Différentes études ont cherché à mettre en évidence le rôle commun de différentes protéines du FPI, afin d'étayer l'hypothèse d'un système de sécrétion de type VI de *Francisella*. Les démonstrations de l'interaction des protéines IglA et IglB, ainsi que la dépendance des gènes *iglA*, *iglB* *dotU* et *pdpB* pour la localisation de PdpD dans la membrane externe tendent à amener vers une confirmation de cette hypothèse. De plus, la surexpression de *pdpD* semble affecter la distribution cellulaire de IglA, IglB et IglC, suggérant ainsi des interactions entre elles. IglC, protéine présente à la fois au niveau du cytoplasme et de la membrane externe est affectée dans sa distribution par une délétion des gènes *pdpB* ou *dotU*, devenant ainsi exclusivement cytoplasmique. De même, IglC semble suivre un processus d'adressage à la membrane externe (Ludu et al., 2008). Plus récemment, les protéines IglI et VgrG ont été mises en évidence comme étant sécrétées dans le cytosol de la cellule hôte. La sécrétion de VgrG ne semble cependant pas dépendante de la présence des autres protéines du locus. A l'inverse, celle d'IglG est dépendante de VgrG (Barker et al., 2009). En 2012, une étude cristallographique de la protéine DotU a permis de mettre en évidence une structure très proche de la protéine TssL, un composant du SST6 (Robb et al., 2012). Cependant, la caractérisation complète de cet hypothétique système de sécrétion de type VI reste encore à réaliser.

### 3.5.3 Régulation du FPI

L'étude de l'expression des différents gènes du FPI en réponse à différents stimuli a permis de mettre en évidence plusieurs régulateurs (voir figure 18). L'augmentation de l'expression de certains gènes du FPI a notamment pu être mise en évidence dans des bactéries exposées au peroxyde d'hydrogène (Golovliov et al., 1997; Twine et al., 2006) ou à des conditions de carence en fer (Deng et al., 2006). Ces conditions de croissance ayant pour but de mimer l'environnement macrophagique, ces études permettent d'émettre l'hypothèse d'une induction des gènes du FPI lors de la phase infectante de la bactérie.

#### a. MglA et SspA

La protéine MglA a été mise en évidence pour son rôle dans la croissance intracellulaire et dans la virulence de la bactérie, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, chez *F. novicida* (Baron and Nano, 1998; Lauriano et al., 2003, 2004) et la souche *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 (Santic et al., 2005). Une étude a aussi mis en évidence l'importance de MglA dans la croissance intracellulaire de la sous-espèce *novicida* chez l'amibe. Le gène *mglA* est situé sur l'opéron *mglAB*, qui est exprimé en phase exponentielle de croissance. La protéine MglA présente 20% d'identité avec la protéine SspA (Stringent Stravation Protein A) d'*E. coli* (Baron and Nano, 1998; Charity et al., 2007), un régulateur transcriptionnel de gènes, associé à l'ARN polymérase, qui régule l'expression d'un sous-groupe de gènes en réponse à un stress nutritionnel (Barker and Klose, 2007; Baron and Nano, 1999; Ishihama and Saitoh, 1979; Williams et al., 1994). La mise en évidence en 2004, par RT-PCR, de niveaux d'expression fortement réduits des gènes *pdpD*, *iglA*, *iglC*, *iglD* et *pdpA* dans un mutant *mglA* a suggéré un rôle de régulateur des différents gènes du FPI (Lauriano et al., 2004). Des analyses transcriptionnelles ont identifié qu'une mutation dans le gène *mglA* entraînait la modification de l'expression de 102 gènes (Brotcke et al., 2006), dont tous les gènes du FPI.

Les régulations réalisées par MglA possèdent un rôle essentiel dans la modulation de la biogénèse et dans l'échappement du phagosome, et plus précisément au niveau de l'acidification du phagosome (Bonquist et al., 2008; Santic et al., 2005). Des études mettent en évidence un rôle de MglA pour la survie de la bactérie dans un environnement à fort taux en oxygène (Guina et al., 2007; Honn et al., 2012).

Plus récemment, l'identification d'une protéine, nommée SspA, interagissant avec MglA pour initier la transcription de facteurs de virulence, tels *IglA*, *IglC* et *PdpA*, en se liant à l'ARN polymérase, a été réalisée chez LVS et SCHU S4 (Charity et al., 2007; Larsson et al.,

2005). D'autres études ont permis de mettre en évidence que le complexe MglA-SspA-ARN polymérase est contrôlé par la guanosine tétraphosphate (ppGpp) ainsi que par une protéine putative se liant à l'ADN, FevR (Charity et al., 2009). Ces deux protéines ont, elles aussi, été identifiées comme étant dépendantes de signaux environnementaux et nutritionnels (Charity et al., 2009).

#### b. FevR et ppGpp

Le régulateur FevR (aussi appelé PigR), mis en évidence la première fois chez la sous-espèce *novicida*, est retrouvé dans toutes les sous-espèces de *F. tularensis*. Il régule à la fois l'expression des gènes du FPI et d'autres gènes du régulon *mglA/sspA* au moyen d'une alarmone, appelée ppGpp (guanosine tétraphosphate) qui favorise cette interaction. Cette alarmone semble essentielle à la mise en place de la virulence. En effet, des mutants dans le gène *ppGpp* présentent un défaut de croissance intra-macrophagique ainsi qu'une forte atténuation de la virulence chez la souris (Charity et al., 2007, 2009). L'expression seule de FevR n'est pas suffisante pour induire l'expression de MglA. En effet, la présence de MglA est essentielle pour que la régulation par FevR ait lieu, via une boucle de rétroactivation (Brotcke and Monack, 2008). FevR n'interagit pas directement avec le complexe MglA-SspA-ARN polymérase, suggérant une action sur le FPI parallèlement à celui-ci (Brotcke and Monack, 2008; Rohlfing and Dove, 2014).

#### c. PmrA

L'étude des systèmes à deux composants chez *F. tularensis* a permis de mettre en évidence un autre régulateur du FPI. Les systèmes à deux composants sont utilisés par les bactéries dans le but d'adapter l'expression de certains gènes en fonction de facteurs environnementaux, nutritionnels par exemple. C'est ainsi que PmrA a été identifié chez *F. novicida* comme un régulateur de l'expression des gènes de FPI issu d'un système à deux composants orphelin de son capteur. (Mohapatra et al., 2007). Chez *F. novicida*, un mutant dans *pmrA* présente un fort défaut de multiplication intracellulaire ainsi qu'une virulence fortement atténuée chez les souris. Des expériences de puce à ADN ont permis d'identifier 65 gènes, dont 11 gènes situés dans le FPI, régulés par PmrA. PmrA possède la capacité de s'autoréguler, ainsi que de réguler l'expression des gènes du FPI. Pour cela, la protéine se fixe sur les promoteurs de *pmrA* et de *pdpD*. De plus, ce régulateur est capable d'interagir avec le complexe MglA-SspA, qu'il soit lié ou non à l'ARN polymérase.

La capacité de PmrA à activer son expression ainsi que celle du FPI, repose sur sa phosphorylation par une histidine kinase : KdpD. Un mutant dans le gène *kdpD* présente,

comme un mutant dans le gène *pmrA*, un fort défaut de multiplication intracellulaire et une atténuation de la virulence *in vivo* (Bell et al., 2010). PmrA et KdpD constituent le premier système à deux composants identifié chez *Francisella*.

#### d. MigR

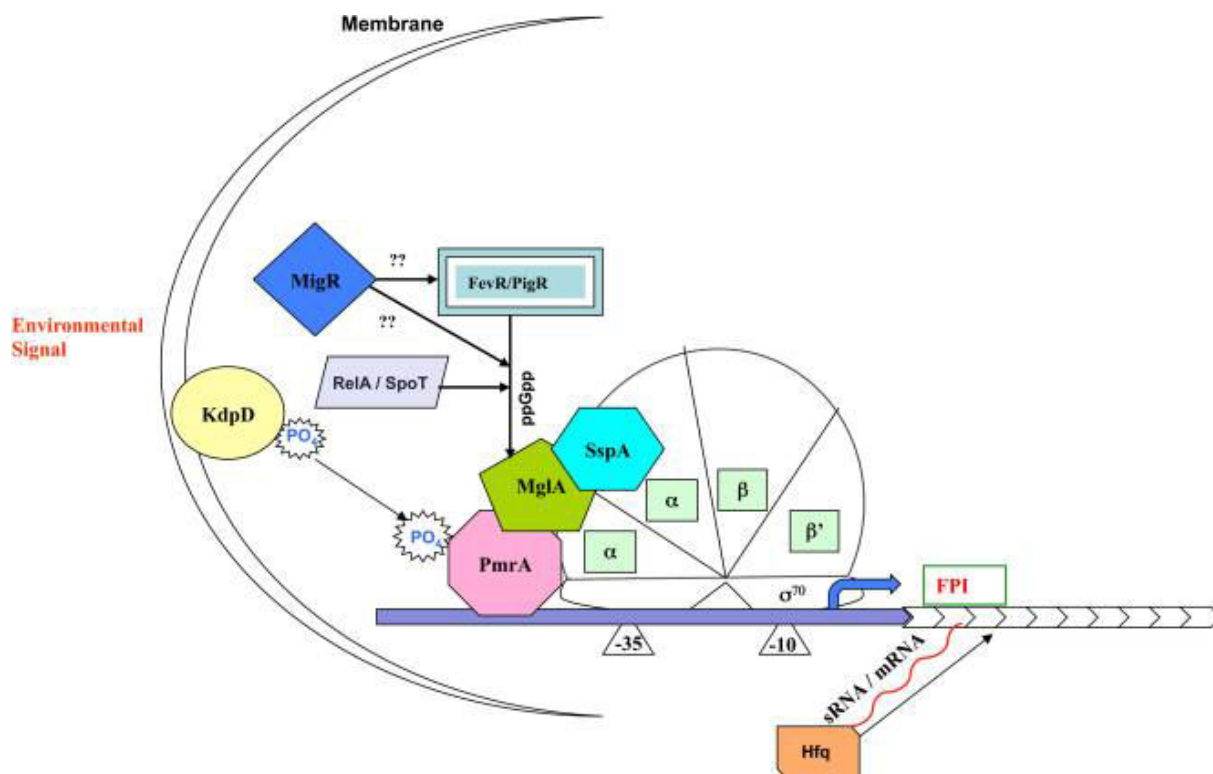
Un autre régulateur de l'opéron *iglABCD* a été mis en évidence et appelé MigR (Macrophage Intracellular Growth Regulator). Un mutant dans ce régulateur possède une capacité moindre à se multiplier dans les macrophages dérivés de monocytes humains. La transcription de *FevR* est très affectée par une mutation de MigR, suggérant une action indirecte de MigR sur le FPI (Buchan et al., 2009). En réduisant l'expression de *FevR*, MigR permettrait une répression de l'opéron *iglABCD*.

#### e. Hfq

Hfq est un régulateur post-transcriptionnel qui, sous la forme d'une protéine chaperonne permet notamment l'interaction des petits ARN avec leurs ARN cible (Valentin-Hansen et al., 2004). Son importance a été particulièrement mise en évidence dans la résistance au stress ainsi que lors de la formation de biofilms (Chambers and Bender, 2011). Hfq est impliqué dans la virulence de nombreux pathogènes tels *V. cholerae* (Ding et al., 2004), *S. typhimurium* (Sittka et al., 2007), *B. abortus* (Robertson and Roop, 1999), *L. monocytogenes* (Christiansen et al., 2006), *P. aeruginosa* (Sonnleitner et al., 2003) ou *E. coli* uropathogène (Kulesus et al., 2008).

Chez *Francisella*, Hfq est la seule protéine décrite à ce jour régulant négativement l'expression d'une partie des gènes du FPI. Son action régulatrice se situe au niveau de l'opéron *pdp*, contenant les gènes *pdpA*, *pdpB*, *pdpC*, *dotU*, *vgrG*, *iglE*, *iglF*, *iglG*, *iglH*, *iglI*, *iglJ* et *pdpE*. Un mutant *hfq* de *Francisella* présente un défaut aux premières étapes de la croissance cellulaire, une forte atténuation chez la souris ainsi qu'une résistance aux stress amoindrie et notamment au niveau des stress thermiques, salins et dénaturants (Meibom et al., 2009).

**Figure 18 :** Schéma de la régulation des gènes de l'îlot de pathogénicité de *Francisella*.  
D'après (Dai et al., 2011)



### 3.6. Les systèmes de sécrétion

De nombreuses bactéries possèdent la capacité de sécréter des protéines dans le milieu extérieur. Ces protéines peuvent avoir des rôles divers : l'acquisition de nutriments, la biosynthèse de pompes à efflux, la biosynthèse d'un pili. Cette sécrétion à la surface bactérienne nécessite le passage des protéines à travers la membrane interne, le périplasme et la membrane externe. C'est à ce stade qu'interviennent les systèmes de sécrétion, qui sont, chez les bactéries à Gram négatif, au nombre de 8 : type I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et système de sécrétion à deux partenaires (Kostakioti et al., 2005). Certains de ces systèmes (SSTIII, IV et VI) ont été décrits comme impliqués dans l'interaction entre les bactéries et les cellules eucaryotes, et plus précisément dans la translocation d'effecteurs bactériens dans le cytoplasme des cellules (Schwarz et al., 2010).

Des analyses bio-informatiques du génome de *Francisella* ont permis d'identifier la présence de trois machineries de sécrétion : un système de sécrétion de type I, un système de

sécrétion de type II représenté par un pili de type IV et un système de sécrétion de type VI, encodé par le FPI.

### 3.6.1 Le système de sécrétion de type I

Le SSTI est décrit comme utilisé par les bactéries pour injecter des toxines et différents facteurs de virulence dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (voir figure 19). Par exemple, chez *E. coli*, la protéine TolC, l'un des composants du SSTI présent au niveau de la membrane externe, est impliqué dans la sécrétion de l'hémolysine, via le complexe HlyBD-TolC (Holland et al., 2005), et de petites molécules toxiques, via le complexe AcrAB-TolC (Eicher et al., 2012). Le génome de *F. tularensis* possède trois paralogues de TolC : TolC, FtlC et SilC (Gil et al., 2006). TolC et FtlC possèdent une activité dans la résistance aux antibiotiques, mais seule TolC a été mis en évidence comme ayant un rôle critique dans la virulence des souches LVS (Platz et al., 2010). Par ailleurs, un mutant dans le gène *tolC* a été décrit comme hypertoxique dans les macrophages humains et murins (Kadzhaev et al., 2009).

### 3.6.2 Système de sécrétion de type II et Pili de type IV

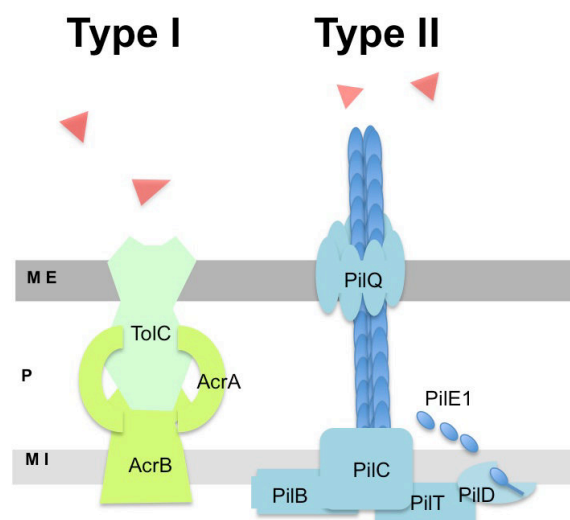
Le SST II, qui est la principale branche de la voie générale de sécrétion (Sec), permet la translocation de protéines depuis le périplasme à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif (voir figure 19). Ce SSTII, dont l'architecture générale est similaire à la machinerie de pili de type IV (TFP), a notamment été étudié chez *Klebsiella oxytoca*. Dans ce modèle, le SSTII est composé de 15 protéines dont certaines sont homologues à des composants de la machinerie de sécrétion du Pili de type IV (Ayers et al., 2010; Chen and Dubnau, 2004). Le TFP est un appendice filamenteux qui est impliqué dans la virulence de nombreuses bactéries, notamment en permettant l'attachement à la cellule hôte (Ayers et al., 2010). SSTII et TFP, bien qu'utilisant des composants homologues pour médier l'export de substrats, possèdent des propriétés uniques, les distinguant du point de vue de leur fonctions biologiques.

Les différentes sous-espèces de *F. tularensis* possèdent des capacités de sécrétion différentes. Chez la souche *novicida*, une sécrétion de protéine par le SSTII a pu être observée. Le génome de *Francisella* contient un certain nombre de gènes similaires à des

gènes connus du TFP : *pilQ*, codant pour une sécrétine et six gènes prédits comme encodant un pili de type 4 (*pilE1* à *pilE6*) (Chakraborty et al., 2008; Gil et al., 2004; Hager et al., 2006; Larsson et al., 2005). Actuellement, peu d'éléments sont connus quant à l'implication du SSTII dans la virulence de *Francisella*. Cependant, l'importance des gènes *pilC* et *pilQ* pour la virulence de la souche SCHUS4 a pu être mise en évidence (Forslund et al., 2010). La piline PilA (PilE1) est, elle, requise pour la virulence chez les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* (Forslund et al., 2006, 2010).

**Figure 19 :** Les systèmes de sécrétion de type I et II. D'après (Ramond and Gesbert et al., 2012)

M E : membrane externe ; P : périplasme ; M I : membrane interne





## **Chapitre III : Nutrition et virulence**

Tous les organismes, et notamment les bactéries, ont évolué afin de maximiser leur production d'énergie à partir des nutriments à leur disposition. La nutrition des bactéries *in vivo* est un domaine d'études important des relations hôtes-pathogènes. En effet, pour survivre et se multiplier dans un hôte, une bactérie doit être en mesure d'adapter son métabolisme à la fois au nutriment présent chez l'hôte mais aussi aux conditions physiques environnantes.

Cependant, les connaissances sur le métabolisme des pathogènes sont assez limitées. En effet, la majorité des études portant sur la virulence s'intéresse à la « virulence classique », la recherche de nouveaux facteurs de pathogénicité bactériens. De plus, la complexité nutritionnelle des micro-environnements de l'hôte ainsi que la difficulté d'étudier des activités enzymatiques redondantes par des approches de génétique classique rend les recherches difficiles. Cependant, l'identification de gènes impliqués dans le métabolisme, par approche transcriptomique ou par criblage de banque de mutants, tend à inverser cette tendance.

La nutrition bactérienne étudie donc à la fois le métabolisme, c'est-à-dire les voies d'anabolisme et de catabolisme bactérien, mais aussi les mécanismes de capture et de transport des nutriments.

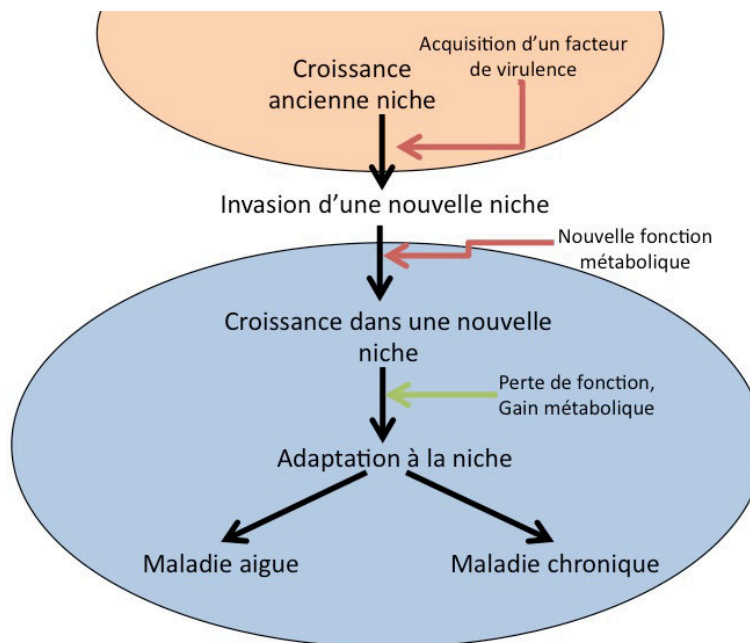
## **1. Virulence et immunité nutritionnelle**

De nombreux mécanismes d'acquisition de nutriments ont été mis en évidence chez les pathogènes. Certains de ces mécanismes sont particulièrement ou uniquement utilisés pour la nutrition dans le cadre de l'infection. Il peut s'agir, par exemple, de systèmes de transports ou d'enzymes sécrétées. Dans le cadre très particulier des bactéries à multiplication intracellulaires (*Shigella*, *Brucella*, *Salmonella*, *Legionella*,...), on retrouve notamment différents systèmes de translocation d'effecteurs microbiens possédant un rôle de manipulation de la cellule hôte en interférant avec les voies de signalisation de celle-ci. Certains de ces effecteurs ont pour fonction de permettre l'extraction de nutriments essentiels à la prolifération de la bactérie, présents dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Une part des défenses immunitaires innées des cellules eucaryotes passe par une restriction de l'accès aux nutriments pour les pathogènes, l'exemple le plus emblématique étant la séquestration du fer. Ainsi, de la même manière que les cellules hôtes se sont adaptées pour limiter l'accès des pathogènes aux nutriments, les bactéries ont développé des stratégies pour exploiter les nutriments disponibles de l'hôte afin de se multiplier. Le concept de « virulence nutritionnelle » se base sur des mécanismes de virulence ciblant particulièrement les

nutriments, ainsi que les voies de biosynthèse ou de dégradation eucaryotes, dans le but de suppléer à une limitation en nutriment de la cellule hôte. Cette virulence nutritionnelle permet non seulement la croissance des bactéries dans l'hôte mais aussi la colonisation de nouveaux sites d'infection (voir figure 20).

**Figure 20 :** L'acquisition d'un facteur de virulence associée à une adaptation métabolique permet l'envahissement d'une nouvelle niche. Librement inspiré de (Rohmer et al., 2011)



## 1.1 L'acquisition de nouvelles voies métaboliques : le premiers pas vers la colonisation

De nombreuses observations démontrent que pour envahir une nouvelle niche de l'hôte, un pathogène doit acquérir de nouveaux facteurs de virulence (Schmidt and Hensel, 2004). Afin de survivre dans ce nouvel environnement, la bactérie doit posséder la machinerie métabolique nécessaire à l'exploitation des nutriments présents dans cette niche. Dans ce cas, on peut observer des gènes impliqués directement ou indirectement dans la nutrition uniquement chez les souches pathogènes d'une même espèce. Ces gènes de métabolisme sont localisés dans des régions du génome acquis durant l'évolution de la bactérie et que l'on nomme îlot de pathogénicité.

L'acquisition de gènes de virulence nutritionnelle se fait, à la fois par des transferts horizontaux d'îlots de pathogénicité et via des éléments génomiques mobiles (Rohmer et al., 2011), de façon similaire aux autres gènes de virulence dit « classique ». Ces gènes de virulence nutritionnelle codent soit pour un processus métabolique spécifique, soit pour un effecteur bactérien, qui sera injecté dans la cellule hôte, afin de manipuler les besoins en nutriments de la cellule ou les enzymes de dégradation des macromolécules (Alkhuder et al., 2009; Niu et al., 2012; Price et al., 2011). Dans les parties suivantes, nous expliciterons le rôle de l'acquisition de gènes de nutrition dans la virulence de quelques bactéries pathogènes.

### 1.1.1 Utilisation du tétrathionate par *Salmonella typhimurium*

Des études récentes ont permis de mettre en évidence un avantage de croissance dans la lumière de l'intestin humain, pour des souches de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhimurium, ayant acquis, par un îlot de pathogénicité, la capacité de respirer le tétrathionate (Winter et al., 2010). En effet, les bactéries colonisant la lumière de l'intestin humain produisent de grandes quantités d'H<sub>2</sub>S, très toxiques pour la muqueuse intestinale. Pour se protéger, la muqueuse est en mesure de convertir l'H<sub>2</sub>S en un composé moins toxique, le thiosulfate (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (Winter et al., 2010).

L'infection à *S. typhimurium* est caractérisée par une forte inflammation, induite par les facteurs de virulence de *Salmonella*, encodés par les îlots de pathogénicité SPI 1 et 2. Cette inflammation résulte de la production par la bactérie de grandes quantités de radicaux azotés et de réactifs oxygénés dans la lumière intestinale. La production de radicaux azotés libres a été acquise par certaines souches de *Salmonella* via un phage lysogénique encodant le translocateur SopE (Lopez et al., 2012).

En présence de ces radicaux libres, les thiosulfates sont oxydés en tétrathionates, toxiques pour les coliformes (Winter et al., 2010). Contrairement aux autres coliformes, *Salmonella* est en mesure d'utiliser le tétrathionate pour exploiter l'éthanolamine ou le 1,2-propanediol comme une source de carbone en anaérobiose (Price-Carter et al., 2001)(voir figure 21). Ce métabolisme confère donc à cette sous-espèce un double avantage métabolique, lui permettant ainsi d'envahir efficacement l'intestin de son hôte (Lawley et al., 2008; Stecher et al., 2007) (voir figure 21).

La respiration du tétrathionate, réalisée grâce au cluster de gène *ttrABC* localisé dans le SPI2, est essentiel pour la virulence de *Salmonella* (Hensel, 2000). Ce locus code les sous-

unités de la tétrathionate réductase anaérobie (*ttrABC*) et un système à deux composants (*ttrRS*) assurant la régulation des gènes *ttr*.

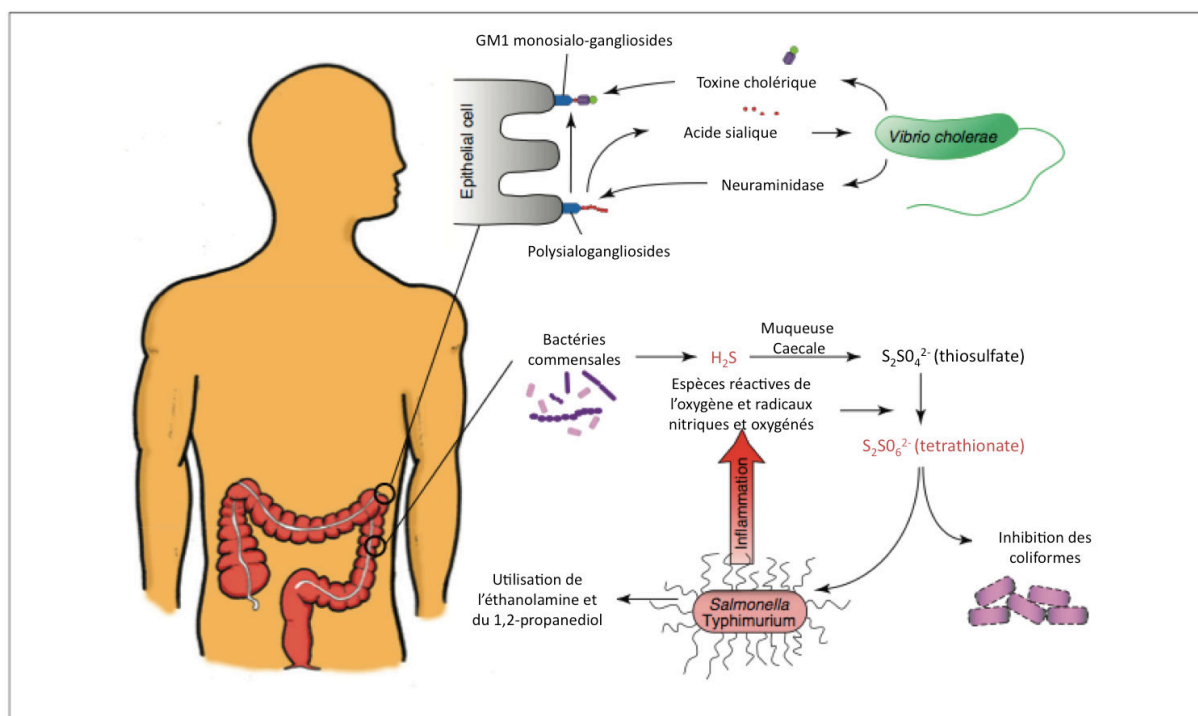
Le locus *ttr* semble particulièrement important lorsque la réponse inflammatoire de l'hôte est mise en place, à la suite de l'activation de SPI1. Une hypothèse a donc été posée quant à la sélection des souches de *S. typhimurium* ayant acquis ce cluster de gène chez l'hôte. De façon notable, le SPI2 de *Salmonella* contient à la fois des gènes de virulence dit « classique » et des gènes de virulence nutritionnelle. Ce SPI2 est donc un bel exemple des liens indissociables entre virulence et nutrition.

### 1.1.2 Utilisation de l'acide sialique par *Vibrio cholerae*

L'infection par *Vibrio cholerae* met bien en avant le lien entre nutrition et virulence. En effet, l'îlot de pathogénicité de *Vibrio* (VPI2), exclusivement retrouvé chez les espèces colonisant l'intestin, code à la fois pour des protéines impliquées dans la virulence bactérienne classique et nutritionnelle. En effet, VPI2 encode une neuraminidase (*nan*-*nag* cluster) qui est en mesure de convertir un polysialoganglioside de membrane eucaryote en GM1 monoganglioside. Le monoganglioside ainsi formé est capable de fixer la toxine cholérique et de provoquer la pathologie (voir figure 21). Cette conversion, nécessaire à la pathogénicité de *V. cholerae*, entraîne la libération d'acide sialique par le récepteur membranaire GM1 (Galen et al., 1992; Jermyn and Boyd, 2002). C'est cette libération d'acide sialique qui va permettre d'apporter une source d'énergie à la bactérie. En effet, la VPI2 code aussi pour tous les gènes impliqués dans la capture (*nanH*), le transport (*dctPQM*) et le catabolisme (*nanA*, *nanE*, *nanK* et *nagA*) de l'acide sialique. Cet aspect de la virulence est particulièrement important pour *Vibrio* car l'inactivation de cette voie de catabolisme conduit à une réduction de la capacité de la bactérie à coloniser l'intestin de la souris (Almagro-Moreno and Boyd, 2009)(voir figure 21).

Il est intéressant de noter que le locus *nan*, permettant d'utiliser l'acide sialique comme source de carbone, est exclusivement retrouvé chez les espèces bactériennes et principalement chez les pathogènes des mammifères (*E. coli*, *Shigella* spp., *S. enterica*, *S. aureus*, *Clostridium* spp.) (Rohmer et al., 2011). Chez ces espèces, le cluster *nan* semble montrer des signes de transferts horizontaux (Almagro-Moreno and Boyd, 2009).

**Figure 21 :** Liens entre nutrition et virulence chez *Salmonella typhimurium* et *Vibrio cholerae*. D'après (Rohmer et al., 2011)



### 1.1.3 *Helicobacter pylori*, activité uréase et transport du nickel

*H. pylori* est l'une des seules bactéries capable de se développer dans l'estomac de l'Homme. Cette bactérie est capable de le coloniser, de déclencher des gastrites, des ulcères et dans certains cas des cancers gastriques (Brown, 2000; Cover and Blaser, 2009). Pour ces bactéries, l'urée sécrétée dans le liquide gastrique, est un nutriment important. Ainsi, l'uréase est un facteur de colonisation de l'estomac pour *H. pylori*. Une bactérie dans laquelle l'activité de l'uréase est abolie ne peut se développer dans l'estomac. En effet, l'ammonium, généré par la dégradation de l'urée, neutralise localement l'acidité gastrique, formant ainsi un micro-environnement favorable à la bactérie (Follmer, 2010). Pour avoir lieu, l'activité uréase nécessite la présence de nickel. Chez *Helicobacter*, la capture du nickel est assurée par le transporteur NixA, qui contribue ainsi à la virulence de la bactérie (Bauerfeind et al., 1996; Kusters et al., 2006; Nolan, 2002). Des études bio-informatiques ont révélé que ce transporteur était uniquement présent chez les sous-espèces colonisant l'estomac (*H. pylori*, *H. felis* et *H. mustelae*), mais pas dans les génomes des autres sous-espèces (*H. hepaticus*, *H. bilis*). De plus, un transporteur de nickel homologue à NixA a été retrouvé chez des souches

de *S. aureus* responsables d'infections du tractus urinaire, où une activité uréase est aussi nécessaire à la virulence (Hiron et al., 2010).

## 1.2 Adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte

Le cycle de vie d'un pathogène l'amène à croître dans différentes niches, possédant des disponibilités en nutriments variables. Les bactéries sont donc contraintes à une certaine versatilité métabolique. Par conséquent, les machineries métaboliques nécessaires à la multiplication bactérienne ne sont pas les mêmes selon les voies d'inoculation. Par exemple, pour *F. tularensis*, la voie de synthèse de tryptophane est nécessaire pour la mise en place d'une infection après inoculation intranasale, mais ne l'est pas dans le cas d'une inoculation intradermique (Peng and Monack, 2010). De même chez *B. anthracis*, la voie de biosynthèse des purines est requise lors d'une inoculation intrapéritonéale chez la souris mais pas pour une inoculation intranasale (Jenkins et al., 2011). Ainsi, chez les bactéries pathogènes, certains gènes du métabolisme seront conservés même si ceux-ci ne sont pas nécessaires à la croissance dans une niche favorable. Ces gènes ne seront utilisés par la bactérie que dans le cadre de la virulence nutritionnelle et dans le but d'utiliser les nutriments présents une niche de l'hôte.

Je présenterai dans cette partie, quelques exemples d'adaptation nutritionnelle par subversion des processus métaboliques de l'hôte, par réduction de la taille du génome ou par synchronisation des besoins nutritionnels de l'hôte et de la bactérie.

### 1.2.1 La subversion de la voie de dégradation des protéines

La dégradation des macromolécules de l'hôte par des enzymes sécrétées spécifiques est une stratégie directe et efficace de nutrition des pathogènes. Cependant, certaines bactéries intracellulaires utilisent une autre méthode pour s'assurer un accès aux nutriments, et notamment aux acides aminés : les mécanismes de dégradation de l'hôte.

Le lysosome, par exemple, qui est le principal compartiment cellulaire de dégradation, se trouve être la source d'acides aminés obligatoires lors des infections par *Coxiella* et *Chlamydia* (Ouellette et al., 2011). Des études récentes mettent en lumière une nouvelle approche de la nutrition intracellulaire des bactéries, utilisant les voies de dégradations

eucaryotes, tels le protéasome et l'autophagie, comme une source d'acides aminés, de carbone et d'énergie (Niu et al., 2012; Price et al., 2011).

#### a. *Legionella* et la dégradation protéosomale

Le protéasome, présent dans tous les organismes eucaryotes, fait partie de la machinerie de dégradation des protéines. Il permet le recyclage de protéines anormales ou à la conformation aberrante, auparavant marquées, notamment via ubiquitinylation. *Legionella pneumophila* est un micro-organisme à multiplication intracellulaire facultative, issu de l'environnement, qui prolifère notamment au niveau des amibes (Al-Quadan et al., 2012). Cette bactérie peut accidentellement contaminer l'humain, par la voie d'aérosols, où elle provoque une pneumonie atypique. La croissance de *Legionella* dans les macrophages se fait, après échappement du phagosome, dans des « Vacuoles Contenant le Pathogène » ou PCV (Al-Quadan et al., 2012). La principale source d'énergie de *L. pneumophila* est le métabolisme des acides aminés par le TCA (cycle des acides tri-carboxyliques). En effet, cette bactérie ne possède pas les enzymes nécessaires à la réalisation de la voie de la glycolyse. Le nutriment préférentiel de *Legionella* est la cystéine. Une grande quantité extérieure de cet acide aminé est donc nécessaire à sa croissance. La cystéine, après sa conversion en pyruvate, est en effet métabolisée dans le TCA. Dans la cellule, afin d'obtenir de la cystéine, *L. pneumophila* injecte dans le cytosol, un effecteur protéique semblable aux eucaryotes, appelé F-Box. Cette F-Box, ou Ankyrin B (AnkB) est lipidée par la machinerie cellulaire de farnesylation afin d'être ancrée dans la double membrane phospholipidique du PCV (Al-Quadan et al., 2012). L'ancrage de AnkB à la membrane de PCV provoque un assemblage local de protéines poly-ubiquitinylées au niveau de leur Lysine<sup>48</sup> (Price et al., 2011). L'ubiquitinylation des protéines a pour rôle leur adressage au protéasome et leur destruction. Cela entraîne donc, au niveau de la membrane du PCV, un niveau élevé d'acides aminés pouvant être importés (Al-Quadan et al., 2012). La suppression de la F-Box ou l'interférence avec la machinerie d'ubiquitinylation rend la bactérie incapable de se multiplier dans les macrophages. A l'inverse, une supplémentation du milieu par un mix d'acides aminés ou par de la cystéine permet de compléter totalement ce défaut (Price et al., 2011). De façon remarquable, l'adjonction de pyruvate ou de citrate, deux intermédiaires du TCA, est aussi en mesure de rétablir la croissance intracellulaire d'un mutant dans le gène *ankB* (Price et al., 2011).

L'hypothèse actuelle, quant à l'acquisition du gène *ankB* par *Legionella*, est un transfert horizontal venant de l'amibe, hôte environnemental de la bactérie (Al-Quadan et al., 2012).



### b. *Anaplasma* et l'autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire possédant un double rôle. Elle assure à la fois le recyclage des éléments cellulaires endommagés et une défense immunitaire innée contre les pathogènes intracellulaires. Ainsi, de nombreux pathogènes ont évolué pour éviter cette voie de dégradation par la cellule hôte (Kuballa et al., 2012). A l'inverse, d'autres pathogènes, comme *Anaplasma*, *Coxiella*, *Rickettsia*, *Helicobacter*, *Porphyromonas*, *Legionella* et *Brucella*, provoquent l'autophagie (Gutierrez and Colombo, 2005; Kuballa et al., 2012; Starr et al., 2012). De récentes études ont ainsi permis de mettre en évidence une augmentation provoquée de l'autophagie lors de l'infection intracellulaire par *Anaplasma*, dans le but d'obtenir les acides aminés nécessaires à sa croissance (Niu et al., 2012).

*Anaplasma phagocytophilum*, qui fait partie de l'ordre des *Rickettsiales*, est un parasite obligatoire des granulocytes et des cellules endothéliales de différents mammifères (Niu et al., 2008). Chez l'Homme, l'anaplasmose (encore appelée ehrlichiose) est généralement provoquée par une piqûre de tique et provoque une maladie fébrile aiguë pouvant potentiellement être fatale (Niu et al., 2008). Dans la cellule, la bactérie se multiplie dans des PCV, des vésicules ressemblant à des autophagosomes, mais ne fusionnant pas avec des lysosomes (Niu et al., 2008). Il est intéressant de noter qu'une inhibition de l'autophagie, par le PI3K de classe III, empêche la prolifération de *A. phagocytophilum*, quand une induction de l'autophagie l'augmente notablement (Niu et al., 2008).

Le processus utilisé par *A. phagocytophilum* pour augmenter l'autophagie a été mis en évidence en 2012. L'effecteur bactérien Ats-1 (substrat de secretion-translocation de type IV - 1) est capable de capter Beclin-1, une sous-unité du PI3K de classe III, et Atg14L, qui deviennent localisés au niveau du PCV (Niu et al., 2012). La surexpression d'Ats-1 entraîne le ciblage des PCV et favorise l'infection. A l'inverse, la neutralisation cytosolique, d'Ats-1 via des anticorps spécifiques, ou de Beclin 1 via des siARN suppriment la croissance intracellulaire de la bactérie (Niu et al., 2012). Plus précisément, des souris hétérozygotes pour le gène codant Beclin 1 seront résistantes à une infection à *A. phagocytophilum* (Niu et al., 2012). Ces résultats suggèrent une dépendance de l'infection au niveau d'expression de Beclin 1, exprimée par les cellules. De façon intéressante, l'arrêt de la croissance intracellulaire, dans les cellules pour lesquelles l'autophagie est inhibée, peut être inversé par une supplémentation en excès d'acides aminés essentiels (Niu et al., 2012). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une base nutritionnelle à la subversion de l'autophagie par *A. phagocytophilum*. Il est important de noter que des protéases associées à la membrane de *A. phagocytophilum* sont nécessaires à la dégradation des protéines apportées dans le PCV par

l'autophagie. Ces observations accréditent l'hypothèse d'un rôle de l'autophagie comme source de nutriments pour les bactéries (Niu et al., 2012). Ainsi *A. phagocytophilum* utiliserait l'autophagie comme un moyen de pomper des protéines de l'hôte afin qu'elles soient dégradées par ses propres enzymes et puissent servir de source d'énergie.

Les deux exemples, *L. pneumophila* et *A. phagocytophilum*, mettent bien en évidence un lien direct entre la nutrition bactérienne *in vivo* et la virulence, médiée par des facteurs de virulence dédiés à la subversion des mécanismes de dégradation des protéines de l'hôte.

### 1.2.2 La réduction du génome : un mécanisme d'adaptation des pathogènes

Lorsqu'un pathogène évolue pour coloniser de façon prolongée une nouvelle niche offrant de meilleures sources nutritionnelles, des voies métaboliques, inutiles ou éventuellement délétères, peuvent être perdues. Cette hypothèse a été retenue suite à l'observation de réduction de génome chez des souches s'étant spécialisées pour une niche donnée. Ces observations sont particulièrement nombreuses chez les bactéries intracellulaires, dont le génome possède de nombreux pseudogènes, probablement en raison d'une abondance de nutriments à l'intérieur des cellules eucaryotes, rendant certaines voies métaboliques inutiles. C'est le cas dans le genre *Salmonella* où l'on peut noter entre *Salmonella typhimurium*, pathogène gastro-intestinal et *S. typhi*, pathogène systémique, une disparition de la voie de respiration du tetrathionate. Cette disparition, peut s'expliquer par l'avantage sélectif que cette voie métabolique apporte pour les pathogènes intestinaux, qui n'est pas retrouvé dans le cadre d'une infection systémique (Holt et al., 2009; McClelland et al., 2001; Thomson et al., 2008).

Une autre hypothèse avance que la perte de fonctions métaboliques non essentielles, pourrait contribuer à la virulence bactérienne, en utilisant moins les voies métaboliques. De plus, des expériences de complémentation de pseudogènes (métaboliques ou non) ont mis en évidence qu'une perte de fonction pouvait augmenter la virulence. L'un des exemples le plus marquant est *Salmonella*. En effet, *S. typhi* se différencie du pathogène de l'intestin *S. typhimurium* par la présence de pseudogènes dans l'îlot de pathogénicité SPI3 (*Salmonella* Pathogenicity Island 3). La complémentation de *S. typhi* par les gènes du SPI3 de *S. typhimurium* conduit à une réduction dramatique de l'invasion des monocytes (Retamal et al., 2010). Des résultats comparables sont observables chez *Shigella spp.* En effet *Shigella*, très proche de *E. coli*, se différencie par la perte de son activité lysine decarboxylase (LDC). La

complémentation d'une souche de *Shigella* par le gène codant pour la LDC entraîne une atténuation de la virulence de celle-ci. En effet, l'activité de l'entérotoxine de *Shigella* est inhibée par la cadavérine, générée par décarboxylation enzymatique de la lysine (Maurelli et al., 1998). *Shigella* et *E. coli* entro-invasifs, issus d'un ancêtre commun, ont acquis la capacité à envahir les cellules épithéliales. Le génome de ces espèces a connu, lors de son évolution, une réduction et notamment la perte de plusieurs voies métaboliques. Chez *E. coli* entero-invasif, on peut notamment noter la perte de la voie de dégradation du propionate (Touchon et al., 2009). Cette voie métabolique permet de produire du 2-méthylcitrate, qui bloque l'activité néoglucogénique de la fructose-1,6-biphosphate. Elle contribue à la virulence de nombreux pathogènes (Alteri et al., 2009; Naderer et al., 2006; Rocco and Escalante-Semerena, 2010) et pourrait avoir été sélectionnée car non essentielle et, potentiellement délétère durant la croissance intracellulaire.

Lors des infections chroniques, les pathogènes sont souvent sujets à des réductions de génome. L'un des exemples le plus démonstratif se retrouve lors de l'infection des voies respiratoires par *P. aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose. Cette maladie d'origine génétique entraîne une accumulation de mucus dans les poumons et une colonisation des voies respiratoires par de nombreux pathogènes opportunistes (Govan and Deretic, 1996). L'infection des poumons de malade par *P. aeruginosa* est un signe de capacité respiratoire faible (Langton Hewer and Smyth, 2009; Romling et al., 1994). Il est connu, depuis 2006, que les souches de *P. aeruginosa*, isolées des infections pulmonaires chroniques, ont subi des pertes de voies métaboliques (Smith et al., 2006). Ces pertes semblent liées au panel de nutriments beaucoup plus large dans les voies respiratoires (acides aminés, nitrates,...) que dans le sol ou l'eau, l'habitat naturel de *P. aeruginosa* (Barth and Pitt, 1996; Grasemann et al., 1998; Ohman and Chakrabarty, 1982; Palmer et al., 2007; Smith et al., 2006). L'expression des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, indispensable à la colonisation initiale chez la souris, est régulée par la densité cellulaire (Quorum sensing). Cependant, la croissance de la bactérie dans l'environnement riche qu'est le mucus respiratoire entraîne la perte du gène *lasR*, encodant le régulateur transcriptionnel du Quorum Sensing (Williams and Cámara, 2009). En effet, les bactéries ayant perdu le gène *lasR* possèdent un avantage sélectif en milieu riche en acides aminés, par augmentation de l'expression du régulateur des voies du catabolisme *cbrB*. Elles utilisent aussi plus de nitrates que les bactéries possédant *lasR* (D'Argenio et al., 2007; Hoffman et al., 2010). Par la perte de *lasR*, sont sélectionnées dans les voies respiratoires, des bactéries moins virulentes et plus adaptées aux nutriments disponibles et donc plus à même d'entraîner une infection chronique.

Dans le cas de l'adaptation à une nouvelle niche, la bactérie est donc face à une balance entre préservation et nutrition. Quand le pathogène se trouve dans un environnement où les capacités nutritionnelles apportent plus de bénéfices que la virulence, les mutations auront tendance à réguler négativement la virulence et à favoriser la nutrition.

### **1.2.3 La synchronisation des auxotrophies hôte/pathogène : un rhéostat de la multiplication intracellulaire**

On observe chez plusieurs pathogènes intracellulaires, une évolution vers la synchronisation des auxotrophies avec ceux de leurs hôtes.

Les cellules humaines sont auxotrophes pour la phénylalanine, la valine, la thréonine, l'histidine et la cystéine (Young, 1994). Des études récentes ont mis en évidence que la mort cellulaire eucaryote, concomitante à une inhibition prolongée de la dégradation des protéines par le protéasome, était due à une déplétion en acides aminés essentiels à la synthèse des protéines, et que celle-ci pouvait être abolie par une supplémentation du milieu en cystéine ou avec un pool d'acides aminés essentiels (Suraweera et al., 2012).

De nombreux pathogènes intracellulaires utilisent les acides aminés de l'hôte comme une source de carbone et d'énergie. Cependant, les pools d'acides aminés présents de façon basale dans la cellule ne sont, le plus souvent, pas suffisants pour la multiplication intracellulaire des bactéries. L'hypothèse proposée à la synchronisation des auxotrophies hôte/pathogène, est un rôle de rhéostat de la multiplication intracellulaire, permettant à la bactérie de se multiplier uniquement dans un environnement métabolique favorable.

*L. pneumophila* est un bon exemple de synchronisation des auxotrophies en acides aminés. Cette bactérie est un hôte de l'environnement où elle est retrouvée sous la forme de biofilm, ou de manière intracellulaire dans des amibes (Price et al., 2014). *Legionella* est auxotrophe pour sept acides aminés : l'arginine, la cystéine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la thréonine et la valine (Price et al., 2014). De façon étonnante, *Acanthamoeba*, l'hôte principal de *Legionella* dans l'environnement, est auxotrophe pour l'arginine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine et la valine (Ingalls and Brent, 1983). Il existe donc clairement un recouvrement entre les auxotrophies de ces deux organismes. Un autre hôte de *Legionella*, *Dictyostelium discoideum*, nécessitant l'apport de onze acides aminés, n'est lui pas auxotrophe pour la cystéine, mais son absence entraîne une forte diminution de sa croissance en milieu synthétique (Franke and Kessin, 1977).

Quand la disponibilité en nutriments est élevée, les amibes sont métaboliquement actives et se répliquent sous la forme trophozoïte. Quand l'environnement devient dépleted en nutriments, notamment en acides aminés, ou face à un stress ou à des toxines bactériennes, les trophozoïtes se différencient en kystes, la forme de résistance de l'amibe (Fouque et al., 2012). Ces kystes ont la capacité de repasser à la forme trophozoïte quand l'environnement redevient favorable à sa croissance (Fouque et al., 2012). Dans l'environnement, quand les nutriments deviennent limitants, l'amibe infectée par *L. pneumophila* s'enkyste, formant ainsi une protection pour la bactérie intracellulaire. En effet, lors de l'enkystement, la synthèse des protéines est arrêtée et la dégradation des protéines ubiquitinilées par le protéasome est inhibée. La bactérie n'est donc plus en mesure de capter les nutriments nécessaires à sa croissance. La prolifération est donc stoppée et la bactérie induit un programme de survie en manque de nutriments à l'intérieur des kystes d'amibes. Les kystes d'amibes sont donc artificiellement résistants à l'invasion par *Legionella*, car il serait délétère pour la bactérie de se multiplier dans ce milieu peu riche en nutriment qu'est le kyste et d'être libéré dans un environnement extérieur peu propice à sa croissance. Lorsque le milieu redevient riche, la reprise des activités protéiques de l'amibe permet à nouveau à la bactérie d'utiliser la voie de dégradation du protéasome pour produire les acides aminés nécessaires à sa multiplication (Price et al., 2014).

Cette synchronisation des auxotrophies entre *L. pneumophila* et son hôte facilite donc, par ce rôle de rhéostat de la multiplication, la persistance de la bactérie dans l'environnement, et notamment lorsque celui-ci est peu riche en nutriments.

## 2. Nutrition et virulence chez *Francisella tularensis*

*F. tularensis*, une bactérie capable de survivre dans différents environnements naturels et potentiellement pathogène pour les mammifères, est amenée à croître dans des conditions nutritionnelles variées et à utiliser une grande variété de sources de carbone, d'azote, de phosphore ou de soufre. Récemment, des expériences de criblage de banques de mutants ont permis de mettre en évidence l'importance de la nutrition dans la pathogénicité de *Francisella*.

Dans cette partie, nous traiterons dans un premier temps du métabolisme de la bactérie et dans un second temps de l'importance des systèmes de transport de celle-ci dans la virulence.

## 2.1 Métabolisme et virulence de *Francisella tularensis*

Les voies de l'anabolisme et du catabolisme nécessitent des réactions en cascade, réalisées par des enzymes dédiées, dont l'activité peut être influencée par les changements environnementaux. En effet, pour survivre et croître, une bactérie doit adapter son métabolisme aux changements physiques et nutritionnels de son environnement.

Les bactéries pathogènes utilisent l'organisme hôte comme un système de nutrition comprenant plusieurs environnements nutritionnels. Ce sont donc les capacités métaboliques de l'hôte qui vont déterminer les sources d'énergies utilisables dans les différentes niches de multiplication de *Francisella*. Dans ce cas, les voies métaboliques possèdent donc un rôle primordial dans la multiplication et donc la virulence de la bactérie.

### 2.1.1 Voies prédites et milieu minimum

L'analyse de banques de mutants, *via* des cribles réalisés *in vivo* ou *in vitro*, a permis de mettre en évidence plus de 200 gènes potentiellement impliqués dans la virulence (Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Lai et al., 2010; Meibom and Charbit, 2010; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010). Une importante proportion de ces gènes est impliquée dans le métabolisme ou la nutrition. Cependant, la contribution spécifique de la plupart de ces gènes n'est pas encore déterminée.

Nous considérons ici que la présence ou l'absence d'une voie biosynthétique détermine l'auxotrophie ou la prototrophie pour un nutriment. Par définition, dans un milieu synthétique ou minimum, une bactérie prototrophe est en mesure de produire tous les composants nécessaires à sa croissance à partir d'une source de carbone. Si l'un ou plusieurs gènes de ses voies métaboliques est interrompu ou manquant, une supplémentation du milieu de culture par le substrat correspondant est requise. La bactérie sera donc dite auxotrophe pour ce substrat.

Pour une bactérie intracellulaire ayant une voie de biosynthèse interrompue, deux cas de figure sont possibles lors de l'infection. Soit la bactérie se multiplie dans la cellule de façon identique à la souche sauvage ; dans ce cas, on considère que le milieu intracellulaire possède le substrat en concentration suffisante pour la croissance de la souche mutante. Soit le mutant a besoin d'une supplémentation du milieu de culture pour croître ; dans ce cas on considère

que le milieu intracellulaire ne possède pas, ou en concentration insuffisante, le substrat donné.

Un milieu synthétique, contenant 13 acides aminés, et permettant la croissance de *F. tularensis*, a été mis au point dès 1955 (Traub et al., 1955). Par la suite, l'optimisation des concentrations des différents nutriments le composant a permis de définir le milieu minimum couramment utilisé, appelé milieu Chamberlain ou CDM (Chamberlain, 1965). A l'exception de la cystéine pour les souches SCHU S4 et LVS (Larsson et al., 2005), la nécessité absolue des 13 acides aminés contenus dans ce milieu n'a pas été confirmée expérimentalement. A l'inverse, des voies de biosynthèse fonctionnelles ont été mises en évidence pour les 7 acides aminés non essentiels à la croissance de *F. tularensis* (alanine, asparagine, glutamate, glycine, glutamine, phénylalanine et tryptophane) (Meibom and Charbit, 2010). Cependant, l'auxotrophie de 8 des 13 acides aminés essentiels est explicable par l'étude du génome de *F. tularensis*. En effet, les voies de biosynthèse pour l'arginine, l'histidine, la lysine, la tyrosine, la méthionine, la thréonine, la valine et l'isoleucine sont incomplètes ou absentes du génome de la souche SCHU S4. En ce qui concerne l'isoleucine, la valine et la thréonine, la présence de pseudogènes au niveau d'enzymes clef de leurs voies de biosynthèse rend leur apport essentiel à la croissance de *F. tularensis* (Meibom and Charbit, 2010).

Dans les acides aminés nécessaires à la croissance optimale de *F. tularensis* en milieu synthétique, on distingue deux groupes : les acides aminés strictement requis pour la croissance, appelés « acides aminés essentiels » ; et les acides aminés augmentant notablement la croissance de *F. tularensis*, appelés « acides aminés utiles non essentiels ».

Les auxotrophies, observées chez les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*, ne sont pas toujours transposables à la sous-espèce *novicida*, qui possède des différences nutritionnelles, notamment au niveau du métabolisme de la thréonine et de la valine (Voir tableau 7).

**Tableau 7 :** Tableau des caractères Essentiels, Utiles non essentiels ou Inutiles des acides aminés pour la croissance en milieu synthétique des souches LVS ou U112

Acide aminé	<i>F. tularensis</i> LVS	<i>F. novicida</i> U112
Arginine	Essentiel	Essentiel
Histidine	Essentiel	Essentiel
Lysine	Essentiel	Essentiel
Méthionine	Essentiel	Essentiel
Tyrosine	Essentiel	Essentiel
Cystéine	Essentiel	Essentiel
Isoleucine	Utile non essentiel	Utile non essentiel
Sérine	Utile non essentiel	Utile non essentiel
Aspartate	Utile non essentiel	Utile non essentiel
Leucine	Utile non essentiel	Utile non essentiel
Proline	Utile non essentiel	Utile non essentiel
Thréonine	Utile non essentiel	Non essentiel
Valine	Utile non essentiel	Non essentiel
Alanine	Non essentiel	Non essentiel
Asparagine	Non essentiel	Non essentiel
Glutamine	Non essentiel	Non essentiel
Glutamate	Non essentiel	Non essentiel
Glycine	Non essentiel	Non essentiel
Phénylalanine	Non essentiel	Non essentiel
Tryptophane	Non essentiel	Non essentiel

### 2.1.2 Métabolisme du carbone et virulence

Les acides aminés sont la source préférentielle de carbone de *Francisella* (Steele et al., 2013). Le métabolisme du carbone permet à la bactérie de produire de l'énergie et des précurseurs réactionnels essentiels tels le glucose-6-phosphate, le fructose-6-phosphate, le 3-phosphoglucérate, le phosphoénolpyruvate (PEP) ou l'acétyl-CoA.

La source principale de carbone et d'énergie des bactéries vient des hexoses comme le glucose. Pour cela, plusieurs voies de catabolisme peuvent être utilisées par la bactérie : la glycolyse, le cycle du citrate (TCA), la voie des pentose-phosphates et la voie Entner-Doudoroff. Chacune de ces voies peut être la voie exclusive ou préférée de production d'énergie d'une bactérie. Nous nous intéressons ici plus particulièrement à l'implication de la



glycolyse, du TCA et de la voie des pentoses-phosphates dans la virulence de *F. tularensis*. Sont indiquées dans le tableau ci-dessous les différents gènes codant pour les enzymes de ces voies métaboliques, ainsi que leur rôle dans ces voies et leur identification ou non dans des cribles de virulence (voir tableau 8).

**Tableau 8 :** Voies de métabolisme du carbone et virulence : Les gènes soulignés ont été identifiés dans des cribles, les gènes en bleu n'ont pas été identifiés dans des cribles. Les gènes en rouges ont été identifiés comme étant essentiels à la croissance de *F. tularensis*.

Locus	Nom	Produit du gène	Crible
Glycolyse			
FTT_1295c	<u>glk1</u>	Glucose kinase	
FTT_0414	<u>pgm</u>	phosphoglucomutase	(Weiss, 2002)
FTT_1315c	<u>pgi</u>	Glucose-6-phosphate isomérase	
FTT_1631	<u>glpX</u>	Fructose-1,6-biphosphatase	(Kadzhaev et al., 2009; Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Peng and Monack, 2010; Su et al., 2007; Weiss, 2002)
FTT_1365c	<u>fbaB</u>	Fructose-biphosphate aldolase	(Asare et al., 2010)
FTT_1268c	<u>gapA</u>	Glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase	
FTT_1367c	<u>pgk</u>	Phosphoglycerate kinase	
FTT_1329	<u>gpml</u>	2,3-biphosphoglycerate mutase	
FTT_0709	<u>eno</u>	Enolase	
FTT_0449	<u>pckA</u>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	(Asare et al., 2010)
FTT_1366c	<u>pyk</u>	Pyruvate kinase	
Cycle du citrate			
FTT_0067	<u>glcA</u>	Citrate synthase	
FTT_0083	<u>acnA</u>	Aconitate hydratase	
FTT_1456	<u>idh</u>	Isocitrate déshydrogénase	
FTT_0072	<u>sucA</u>	2-oxoglutarate déshydrogénase	(Weiss, 2002)

<u>FTT_0073</u>	<u>sucB</u>	2-oxoglutarate déshydrogénase	(Llewellyn et al., 2011; Weiss et al., 2007)
<u>FTT_0469</u>	<u>sucD</u>	Succinyl-CoA synthétase	(Asare et al., 2010; Weiss, 2002)
<u>FTT_0470</u>	<u>sucC</u>	Succinyl-CoA synthétase	(Asare et al., 2010; Weiss, 2002)
<u>FTT_0068</u>	<u>sdhA</u>	Succinate déshydrogénase	
<u>FTT_0069</u>	<u>sdhB</u>	Succinate déshydrogénase	
<u>FTT_0070</u>	<u>sdhC</u>	Succinate déshydrogénase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTT_0071</u>	<u>sdhD</u>	Succinate déshydrogénase	
<u>FTT_0265</u>	<u>fumA</u>	Fumarate hydratase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTT_1523</u>	<u>fumC</u>	Fumarate hydratase	
<u>FTT_0498</u>	<u>mdh</u>	Malate deshydrogénase	
Voie des penphoses phosphates			
<u>FTT_1369c</u>	<u>tktA</u>	Transketolase	(Asare and Kwaik, 2010; Tempel et al., 2006)
<u>FTT_0789</u>	<u>rpe</u>	Ribulose-phosphate 3-épimérase	
<u>FTT_1208</u>	<u>rpiA</u>	Ribose-5-phosphate isomérase	
<u>FTT_1365c</u>	<u>fbaB</u>	Fructose biphosphate aldolase	(Asare et al., 2010)
<u>FTT_0114</u>	<u>deoC</u>	Déoxyribose-phosphate aldolase	
<u>FTT_0113</u>	<u>deoB</u>	Phosphopentomutase	(Horzempa et al., 2008; Llewellyn et al., 2011; Weiss, 2002)

**La glycolyse** est une voie du catabolisme qui permet en 10 étapes successives de transformer du glucose en pyruvate, tout en produisant deux ATP. Quatres enzymes de la voie de la glycolyse ont été mises en évidence comme possédant un rôle dans la virulence de *F. tularensis* : GlpX, Pgm, FbaB et PckA (voir tableau 8).

**Le cycle de Krebs** (ou cycle du citrate ou encore « TCA cycle » pour tricarboxylic acid cycle) est une suite de réactions biochimiques permettant, via des intermédiaires métaboliques, de produire de l'ATP. Par la transformation du PEP en oxaloacétate, il prend la

suite de la glycolyse. Six enzymes du cycle de Krebs ont été identifiées dans différents cribles comme pouvant posséder un rôle dans la virulence de *Francisella* : FumA, SdhC, SucA, SucB, SucC et SucD (voir tableau 8). Le cycle de Krebs, et particulièrement les étapes permettant le passage du malate à l'oxoglutarate, semble donc important pour la virulence des différentes sous-espèces de *F. tularensis*.

**La voie des pentoses phosphates** est une voie particulièrement importante du métabolisme du carbone. Elle débute au niveau du glucose-6-phosphate et permet la production de NADPH-H<sup>+</sup> utilisé dans de nombreuses autres réactions, de ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des nucléotides et d'érythrose-4-phosphate, un précurseur des acides aminés aromatiques. Trois étapes de cette voie ont été particulièrement mises en évidence comme importantes dans la virulence de *Francisella* : la transformation du fructose-6-phosphate en xylose-5-phosphate, qui est assurée par la transketolase codée par le gène *tktA* ; la transformation du desoxyribose-5-phosphate en desoxyribose-1-phosphate, catalysée par la phosphopentomutase codée par le gène *deoB* ; la transformation du fructose-1-6-biphosphate en glyceraldéhyde-3-phosphate, catalysée par FbaB (voir tableau 8).

### 2.1.3 Voies de biosynthèse des acides aminés aromatiques et virulence

La voie du shikimate est utilisée par la bactérie afin de produire du chorismate, un précurseur biologique nécessaire à la synthèse des acides aminés aromatiques, du folate, des ubiquinones, des ménaquinones et des sidérophores. Cette voie est donc un carrefour métabolique. L'importance de celle-ci pour la virulence a été mise en évidence la première fois chez *Salmonella*. Par la mutation de différents gènes de cette voie métabolique, des souches atténuées utilisables pour l'immunisation de différentes espèces animales avaient été obtenues (Chatfield et al., 1994, 1995). L'atténuation de la virulence obtenue avec des mutants *aro* de *S. typhimurium* a été identifiée comme étant la conséquence d'une incapacité de la bactérie à générer de l'acide para-benzoïque et dihydroxybenzoïque à partir du chorismate (Hoiseth and Stocker, 1981).

Chez *F. tularensis* SCHU S4, tous les gènes nécessaires à la synthèse du chorismate sont présents dans le génome, de même que les gènes *pabA* et *pabB*, encodant la para-aminobenzoate synthase ainsi que les gènes *folP*, *folC* et *folA*, responsables de la biosynthèse des folates.

La quasi-totalité des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés aromatiques a été identifiée comme importante pour la virulence de *Francisella* (voir tableau 9), mettant bien en évidence l'importance nutritionnelle de cette voie. De plus, certains gènes ont été identifiés comme impliqués dans la croissance et la virulence dans des modèles non mammifère, notamment *in vitro* et *in vivo* chez *D. melanogaster* (Asare and Kwaik, 2010; Moule et al., 2010).

**Tableau 9 :** Voies de biosynthèse et virulence : Les gènes soulignés ont été identifiés dans des cribles, les gènes en bleu n'ont pas été identifiés dans des cribles. Les gènes portant un \* ne sont retrouvés que dans la sous espèce *novicida*

Locus	Nom	Produit du gène	Crible
Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques			
<u>FTT_0963c</u>	<u>aroG</u>	3-desoxy-7-phosphoheptulonate synthase	(Asare et al., 2010; Su et al., 2011)
<u>FTT_1154c</u>	<u>aroB</u>	3-déshydroquinatase synthase	(Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010)
<u>FTT_0471</u>	<u>aroD</u>	3-dehydroquinatase déshydratase	
<u>FTT_0238</u>	<u>aroE1</u>	Shikimate déshydrogénase	(Asare and Kwaik, 2010; Maier et al., 2007; Moule et al., 2010)
<u>FTT_0411</u>	<u>aroE2</u>	Shikimate déshydrogénase	(Asare and Kwaik, 2010; Maier et al., 2007; Moule et al., 2010)
<u>FTT_1155c</u>	<u>aroK</u>	Shikimate kinase	
<u>FTT_0588</u>	<u>aroA</u>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transphérase	(Asare et al., 2010; Llewellyn et al., 2011; Moule et al., 2010; Qin and Mann, 2006)
<u>FTT_0876c</u>	<u>aroC</u>	Chorismate synthase	(Kraemer et al., 2009; Llewellyn et al., 2011)
<u>FTN_1778</u>	<u>trpE *</u>	Anthranilate synthase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_1777</u>	<u>trpG1 *</u>	Anthranilate synthase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_1740</u>	<u>trpA *</u>	Tryptophane synthase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_1739</u>	<u>trpB *</u>	Tryptophane synthase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_1770</u>	<u>trpC *</u>	Indole-3-glycérol phosphate synthase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_1776</u>	<u>trpD *</u>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	(Pechous et al., 2009)
<u>FTN_0191</u>	<u>pheA</u>	Prephenate déshydratase	
<u>FTN_0555</u>	<u>tyrA *</u>	Prephenate déshydrogénase	(Pechous et al., 2009)

### 2.1.4 Voies de biosynthèse des purines, pyrimidines et virulence

Les voies de biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques permettent la production de nucléotides, qui entrent dans la composition des acides nucléiques mais peuvent aussi être utilisés comme source d'énergie (ATP, GTP) ou entrer dans la composition de certains coenzymes (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FAD, ...). Des analyses *in silico* du génome de *F. tularensis* indiquent que celui-ci encode tous les gènes nécessaires à la synthèse *de novo* des purines et des pyrimidines.

La quasi-totalité des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des purines a été identifiée comme importante pour la virulence de *Francisella* (voir tableau 10), mettant bien en évidence l'importance de cette voie. L'incapacité de *F. tularensis* à synthétiser *de novo* des purines, dans un milieu cytosolique macrophagique qui en contient peu (Appelberg, 2006), conduit donc à un fort défaut de multiplication intracellulaire.

Un grand nombre des enzymes de la voie de biosynthèse des pyrimidines possèdent une importance dans la virulence *in vivo* et *in vitro* de *F. tularensis* (voir tableau 10). Ces résultats suggèrent donc une importance de cette voie dans la virulence de la bactérie.

**Tableau 10 :** Voies de biosynthèse des purines et pyrimidines et virulence : Les gènes soulignés ont été identifiés dans des cribles, les gènes en bleu n'ont pas été identifiés dans des cribles.

Locus	Nom	Produit du gène	Crible
Voie de biosynthèse des purines			
<u>FTT_1721c</u>	<u><i>purF</i></u>	Amidophosphoribosyl transférase	(Weiss, 2002; Llewellyn et al., 2011; Moule et al., 2010; Qin and Mann, 2006)
<u>FTT_0894</u>	<u><i>purCD</i></u>	Fusion protéin PurC/PurD	(Asare and Kwaik, 2010)
<u>FTT_0895</u>	<u><i>purN</i></u>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	(Weiss, 2002; Llewellyn et al., 2011; Peng and Monack, 2010)
<u>FTT_1767c</u>	<u><i>purT</i></u>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	(Weiss, 2002; Llewellyn et al., 2011; Moule et al., 2010)
<u>FTT_1720c</u>	<u><i>purL</i></u>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	(Qin and Mann, 2006; Tempel et al., 2006; Weiss, 2002;

			Llewellyn et al., 2011; Peng and Monack, 2010)
<a href="#">FTT_0893</a>	<a href="#">purM</a>	Phosphoribosylformylglycinamidine ligase	(Llewellyn et al., 2011; Tempel et al., 2006; Weiss, 2002)
<a href="#">FTT_0896</a>	<a href="#">purE</a>	5-imidazole ribonucléotide mutase	(Lindgren et al., 2007; Llewellyn et al., 2011; Weiss, 2002)
<a href="#">FTT_0897</a>	<a href="#">purK</a>	5-imidazole ribonucléotide synthase	(Pechous et al., 2009)
<a href="#">FTT_0015</a>	<a href="#">purB</a>	Adenylosuccinate lyase	(Pechous et al., 2009)
<a href="#">FTT_0203c</a>	<a href="#">purH</a>	IMP cyclohydrolase	(Llewellyn et al., 2011; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Tempel et al., 2006; Weiss, 2002)
<a href="#">FTT_0204c</a>	<a href="#">purA</a>	Adenylosuccinate synthase	(Llewellyn et al., 2011; Qin and Mann,)
<a href="#">FTT_0015</a>	<a href="#">purB</a>	Adenylosuccinate lyase	(Pechous et al., 2009)
<a href="#">FTT_1019c</a>	<a href="#">guaA</a>	GMP synthase	
<a href="#">FTT_1317c</a>	<a href="#">guaB</a>	IMP dehydrogénase	
Voie de biosynthèse des pyrimidines			
<a href="#">FTT_1663</a>	<a href="#">carA</a>	Carbamoyl-phosphate synthase	(Asare et al., 2010; Asare and Kwaik, 2010; Llewellyn et al., 2011; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Schulert GS et al., 2009; Weiss, 2002)
<a href="#">FTT_1664</a>	<a href="#">carB</a>	Carbamoyl-phosphate synthase	(Asare et al., 2010; Llewellyn et al., 2011; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Schulert GS et al., 2009; Weiss, 2002; Tempel et al., 2006)
<a href="#">FTT_1665</a>	<a href="#">pyrB</a>	Aspartate carbamoyl transférase	(Asare et al., 2010; Llewellyn et

			al., 2011; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Schulert GS et al., 2009; Weiss, 2002)
<u>FTT_1660</u>	<u>pyrC</u>	Dihydroorotase	(Moule et al., 2010)
<u>FTT_1647c</u>	<u>pyrD</u>	Dihydroorotate déshydrogénase	(Llewellyn et al., 2011; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Weiss, 2002)
<u>FTT_0437c</u>	<u>pyrE</u>	Orotate phosphoribosyltransférase	
<u>FTT_1646c</u>	<u>pyrF</u>	Orotidine-5-phosphate decarboxylase	(Pechous et al., 2009)

### 2.1.5 Manipulation des nutriments cytosoliques de l'hôte par *F. tularensis*

Afin de se répliquer efficacement dans la cellule hôte, *F. tularensis* doit être en mesure d'obtenir tous les nutriments nécessaires à sa multiplication rapide. Cependant, une grande partie des sources de nutriments présents à l'intérieur de la cellule hôte est stockée sous la forme de structures complexes comme le glycogène ou les protéines. Afin d'obtenir ces nutriments sous une forme libre et utilisable, *F. tularensis* est en mesure de manipuler les processus biologiques de l'hôte.

#### a. Régulation du transport cellulaire d'acides aminés par *F. tularensis*

Afin de se multiplier dans les cellules, *F. tularensis* est en mesure de modifier le pool d'acides aminés cytosoliques en augmentant la production d'un importeur membranaire de glutamine : SLC1A5 (Barel et al., 2012). Ce transporteur, impliqué dans l'équilibre cytoplasmique du pool d'acides aminés, est responsable de l'entrée de la glutamine dans la cellule eucaryote. *Francisella* est capable d'augmenter à la fois la quantité d'ARNm, codant pour le transporteur et le nombre de protéines SLC1A5. L'utilisation d'ARNsi, ciblant



spécifiquement les ARNm de SLC1A5, dans le cadre d'une infection par *F. tularensis*, permet d'observer une diminution de moitié de la croissance bactérienne à 24h (Barel et al., 2012).

Une autre étude a permis de mettre en évidence la réduction de la production d'ARNm et de protéines d'un autre transporteur, SLC7A5, lors de l'infection par *F. tularensis* (Fuchs and Bode, 2005). Ce transporteur est impliqué, tout comme SLC1A5, dans l'équilibre du pool d'acides aminés cytoplasmique. SLC7A5 est responsable de l'export de la glutamine vers le milieu extérieur et de l'import d'acides aminés branchés. Il assure donc, avec SLC1A5 l'homéostasie de la concentration de glutamine intracellulaire. Dans les cellules, *F. tularensis* entraîne donc à la fois l'augmentation de la synthèse de l'importeur de glutamine, tout en diminuant la synthèse de l'exporteur, permettant ainsi une augmentation durable de la concentration intercellulaire en glutamine.

En outre, la bactérie est capable d'induire la déglycosylation du transporteur SLC1A5. Pour cela, *F. tularensis* doit être en mesure de sortir du phagosome et de se multiplier dans le cytosol. En effet, un mutant dans le gène *iglC* (incapable de sortir du phagosome) ou *wbt* (incapable de se répliquer dans le cytosol) n'est pas en mesure de réaliser la déglycosylation de ce transporteur (Barel et al., 2012).

La déglycosylation des protéines semble être un mécanisme général consécutif à l'infection par *F. tularensis*. En effet, ce même phénomène est observable sur la protéine hautement glycosylée CD147 (Barel and Charbit, 2013). Ce processus de déglycosylation augmente durant le temps de l'infection et semble être corrélé avec l'augmentation du nombre de transporteurs SLC1A5. Le rôle exact de la déglycosylation n'est pas connu à ce jour mais l'hypothèse de l'utilisation de ces sucres dans la nutrition de la bactérie a été proposée.

#### *b. Manipulation de l'autophagie par F. tularensis*

Un autre mécanisme, visant à augmenter la disponibilité cytoplasmique en acides aminés, a récemment été identifié chez *Francisella* : la manipulation de l'autophagie. L'autophagie est un processus eucaryote, très conservé, qui peut être initié par un large panel de facteurs : une concentration limitante en acides aminés libres, une déplétion en énergie, un signal immunitaire ou l'inhibition de la voie mTor. Ce processus entraîne la formation d'autophagosomes qui a pour rôle la dégradation de composants cellulaires (dans le cadre de la déplétion en nutriments). Ces autophagosomes vont fusionner avec des lysosomes, permettant ainsi la dégradation du contenu vésiculaire. Ce processus de recyclage des

protéines cytosoliques entraîne notamment la libération d'acides aminés libres. L'un des mécanismes d'autophagie est induit par l'inhibition de mTOR, nécessitant l'action de la protéine ATG5 (Steele et al., 2013).

Dans le cytoplasme eucaryote, *F. tularensis* est en mesure d'activer l'autophagie sans passer par la protéine ATG5. Ce processus est nécessaire à la réplication normale de la bactérie car une inhibition de l'autophagie, entraîne une baisse significative de la multiplication (Steele et al., 2013). De plus, des expériences ont permis de mettre en évidence une réplication de *F. tularensis* en absence d'acides aminés dans le milieu de culture cellulaire, réplication non observable dans le cas de cellules ne pouvant pas réaliser l'autophagie indépendante de ATG5 (Steele et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation de l'autophagie par la bactérie peut suffire à produire les acides aminés nécessaires à sa multiplication. A l'inverse, dans un milieu de culture cellulaire contenant des acides aminés, *F. tularensis* peut se multiplier normalement dans des cellules incapables de réaliser l'autophagie ATG5 indépendante (Steele et al., 2013). Ces résultats indiquent donc l'utilisation d'autres stratégies de capture des nutriments eucaryotes par *F. tularensis*.

Une des hypothèses, quant à l'utilité de la manipulation de l'autophagie par la bactérie, est la croissance intracellulaire dans des tissus contenant des concentrations en acides aminés libres faibles. Par ce processus, *Francisella* pourrait artificiellement augmenter la concentration cytoplasmique en acides aminés, dans des conditions où les transporteurs eucaryotes ne permettent pas d'en capter des quantités nécessaires à sa réplication. Le processus cellulaire complet, utilisé par *Francisella*, pour provoquer l'autophagie n'est pas connu à ce jour.

## 2.2 Systèmes de transport et virulence chez *Francisella tularensis*

### 2.2.1 Systèmes de transport de *Francisella* et virulence

Afin de se multiplier efficacement, les bactéries sont dans l'obligation de capter des nutriments dans le milieu extérieur. Pour cela, elles doivent posséder des systèmes de transports dédiés permettant aux nutriments de traverser les barrières physiques de la membrane bactérienne. Ces transporteurs permettent à la bactérie de capter des nutriments

qu'elle ne sait pas ou difficilement synthétiser, des éléments nécessaires à sa production d'énergie ainsi que des ions. Les bactéries intracellulaires doivent, elles, posséder des systèmes de transports particuliers afin de capter les nutriments présents dans le compartiment cellulaire qu'elles infectent. Ces systèmes doivent être d'autant plus efficaces que la concentration du nutriment dans le milieu est faible.

Chez *F. tularensis*, trois grands groupes de transporteurs sont retrouvés : Les transporteurs actifs primaires, 21 transporteurs, les transporteurs actifs secondaires, 92 protéines et les canaux ioniques, 5 protéines (voir tableau 11).

**Tableau 11 :** Transporteurs de *F. tularensis*. Première colonne : Familles de transporteurs. Seconde colonne : nombre de transporteurs prédits comme composant cette famille. Troisième colonne : nombre de transporteurs de cette famille identifiés dans des cribles *in vitro* et *in vivo* comme possédant un rôle dans la virulence.

Famille de transporteurs	Nombre de transporteurs	Nombre de transporteurs identifiés dans des cribles
<b>Transporteurs actifs primaires</b>		
Famille ABC	21	15
<b>Transporteurs actifs secondaires</b>		
Famille MFS	31	18
Famille POT	8	4
Famille APC	11	7
Famille HAAP	6	4
Autres familles	36	17
<b>Canaux ioniques</b>		
Canaux ioniques	6	4
<b>Autres transporteurs</b>		
Autres transporteurs	4	2

#### a. Transporteurs actifs primaires de *F. tularensis* et virulence

Le transport actif primaire utilise l'énergie fournie par l'ATP pour faire traverser la membrane bactérienne aux nutriments. Ils représentent chez *Francisella* 17,7% des protéines de transport (voir tableau 11). Ces transporteurs actifs primaires sont divisés en 4 familles : les F-ATPases, les P-ATPases, les IISP et les ABC transporteurs. Les ABC transporteurs sont les plus retrouvés chez *Francisella* (76,2% des transporteurs actifs primaires). Ils peuvent être responsables du transport d'acides aminés, de sucres, de polysaccharides, d'acides gras, de peptides, d'ions ou être impliqués dans l'efflux de composés toxiques (Meibom and Charbit, 2010). Ils sont composés de 12 hélices  $\alpha$ , formant un canal dans la membrane. Les transporteurs de la famille ABC sont caractérisés par la présence d'une séquence d'acides aminés appelée « ATP-Binding Cassette », impliquée dans la fixation de l'ATP sur la phase cytosolique de la protéine.

Vingt et une protéines impliquées dans le transport actif primaire ont été mises en évidence dans des cribles comme étant nécessaires à la virulence de *Francisella* (Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Su et al., 2007; Weiss et al., 2007). Ces protéines, codées par des gènes identifiés dans ces cribles, sont notamment impliquées dans le transport des nitrate/sulfonate/taurine, du manganèse, du zinc, des lipoprotéines, de la putrescine, de la méthionine, de proton, ainsi que dans l'efflux de composés toxiques et dans la résistance au toluène (Meibom and Charbit, 2010). Les gènes codant pour les transporteurs nitrate/sulfonate/taurine, manganèse/ion zinc et méthionine ont été aussi identifiés comme étant régulés positivement lors de l'infection de cellules (Wehrly et al., 2009). Le transporteur, de la famille ABC, de la méthionine *FTT\_1125* a été identifié à la fois dans des cribles *in vitro* (Maier et al., 2007) et *in vivo* (Kraemer et al., 2009; Su et al., 2007), démontrant bien la contribution directe des transporteurs actifs primaires dans la virulence de *F. tularensis*.

#### b. Transporteurs actifs secondaires de *F. tularensis* et virulence

Les transporteurs actifs secondaires utilisent la différence de potentiel électrochimique de la membrane pour faire transiter les éléments du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Ce type de transporteur est le plus retrouvé chez *F. tularensis* (75% des protéines de transport). Il existe deux principaux types de transports actifs secondaires :

l'antiport et le symport. L'antiport permet la traversée de deux molécules dans deux sens opposés et le symport dans le même sens. Il existe plusieurs sous-familles de transporteurs actifs secondaires : La sous-famille MFS (Major Facilitator Superfamily), représentée par 31 protéines chez *Francisella* (voir tableau 11 et 12), qui participe au transport de nombreux nutriments dont des acides aminés et des sucres et à l'efflux de molécules toxiques pour la bactérie. On retrouve aussi la sous-famille des transporteurs APC (superfamille des transporteurs Acides aminé/Polyamine/Organocation), qui représente 11 protéines chez *F. tularensis*, la sous-famille des perméases pour hydroxy acides aminés aromatiques (HAAAP), présente au nombre de 7 protéines, et la sous-famille des transporteurs d'oligopeptides dépendant des protons (POT), représentée par 8 protéines (Meibom and Charbit, 2010).

Cinquante deux protéines participant au transport actif secondaire ont été retrouvées dans des cribles *in vitro* ou *in vivo* (Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Su et al., 2007; Tempel et al., 2006; Weiss, 2002) et 8 protéines ont été identifiées comme régulées positivement lors de l'infection de cellules (Wehrly et al., 2009) (voir tableau 12).

Le gène *gadC*, par exemple, qui détermine une protéine prédite comme responsable du transport du glutamate/ $\gamma$ -aminobutyrate appartenant la sous-famille des APC, a été identifié dans 4 cribles différents (Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Peng and Monack, 2010; Weiss, 2002). Un travail de recherche effectué dans notre laboratoire (voir annexe 2) a permis de mettre en évidence l'implication de ce transporteur de glutamate dans la résistance au stress oxydatif dans les macrophages (Ramond et al., 2013).

**Tableau 12 :** Transporteurs actifs secondaires de la famille MFS de *F. tularensis* et virulence. En rouge : Transporteurs prédits comme faisant partie de la sous-famille des transporteurs phagosomaux (Pht). D'après (Meibom and Charbit, 2010).

Gène	Sous-Famille	Substrat transporté	Données expérimentales
FTT0006	MFS	proline/betaine	-
FTT0026c	MFS	efflux drogue, transport du fer	Crible (Asare et al., 2010) Régulé positivement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT0028c	MFS	efflux drogue, transport du fer	Crible (Asare et al., 2010; Moule et al., 2010; Weiss, 2002) Régulé positivement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT0053	MFS	Acide aminé ?	Crible (Maier et al., 2007; Moule et al., 2010; Weiss, 2002)
FTT0056c	MFS	Acide aminé ?	Crible (Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Weiss, 2002)
FTT0070c	MFS	Homologue de AmpG	Régulé par MglA (Brotcke et al., 2006)
FTT0104c	MFS	Acide aminé ?	Crible (Asare and Kwaik, 2010; Kraemer et al., 2009)
FTT0127c	MFS	Efflux multidrogue ?	Crible (Kraemer et al., 2009)
FTT0129	MFS	Acide aminé ?	Crible (Asare et al., 2010; Qin and Mann, 2006)
FTT0164c	MFS	Efflux bicyclomycine	Crible (Asare et al., 2010)
FTT0280c	MFS	Efflux multidrogue ?	-
FTT0442c	MFS	Efflux bicyclomycine	Régulé négativement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT0444	MFS	Efflux tetracycline	Crible (Su et al., 2007)
FTT0488c	MFS	?	Régulé négativement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT0671	MFS	Acide aminé ?	-
FTT0708	MFS	?	Crible (Asare et al., 2010; Su et al., 2007) Régulé positivement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT0719	MFS	proline/betaine	Crible (Asare et al., 2010)
FTT0725c	MFS	glycerol-3-phosphate	Crible (Asare and Kwaik, 2010)
FTT0804	MFS	proline/betaine	Régulé négativement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)

FTT0931	MFS	glucose/galactose	-
FTT0995	MFS	proline/betaine	Crible (Asare et al., 2010; Moule et al., 2010)
FTT1148c	MFS	?	-
FTT1196c	MFS	proline/betaine	Crible (Peng and Monack, 2010)
FTT1256	MFS	Efflux multidrogue	Crible (Asare et al., 2010) Régulé négativement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT1291	MFS	D-galactonate	-
FTT1311	MFS	Efflux multidrogue	Crible (Moule et al., 2010)
FTT1473c	MFS	galactose/proton symport	Crible (Asare et al., 2010)
FTT1474c	MFS	galactose/proton symport	Crible (Asare and Kwaik, 2010)
FTT1683c	MFS	Efflux multidrogue	-
FTT1727c	MFS	Efflux chloramphenicol	Régulé négativement dans les cellules (Wehrly et al., 2009)
FTT1783	MFS	proline/betaine	Crible (Moule et al., 2010)

### c. Transporteurs d'ions et autres transporteurs de *F. tularensis*

Les canaux ioniques permettent le transit rapide des ions d'un côté à l'autre de la membrane dans le sens du gradient électrochimique. Ils jouent ainsi un rôle dans l'homéostasie cellulaire. Chez *Francisella*, ils sont notamment impliqués dans le transport du potassium, du chlore, du glycérol et du glutamate. Les transporteurs de potassium et de glutamate/chlorure ont été identifiés dans des cribles (Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Weiss, 2002). Ces canaux possèdent donc un rôle dans la virulence de *Francisella*.

Au niveau des transporteurs non classifiés, les protéines assurant le transit du fer et du nicotinamide ont été identifiées dans des cribles comme étant importantes pour la pathogénicité bactérienne de *Francisella* (Asare et al., 2010; Moule et al., 2010; Su et al., 2007).

## 2.2.2 Transporteurs d'acides aminés et la virulence

Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'importance de l'acquisition des nutriments et de l'adaptation nutritionnelle pour la croissance intracellulaire de *Francisella* (Alkhuder et al., 2010; Napier et al., 2012; Peng and Monack, 2010; Schulert GS et al., 2009; Steele et al., 2013). De plus, les résultats de plusieurs recherches ont mis en lumière l'utilisation des acides

aminés comme source de carbone préférentielle de *Francisella* (Meibom and Charbit, 2010; Raghunathan et al., 2010; Steele et al., 2013). Leur capture est donc un enjeu majeur pour la multiplication de la bactérie.

#### a. Transporteurs d'acides aminés et virulence

Les acides aminés peuvent être une source de carbone, d'azote et participer à la synthèse des protéines de la bactérie. Pour cela, les acides aminés sous formes libres ou peptidiques dans le cytoplasme eucaryote, doivent être captés par la bactérie. L'importance du transport des acides aminés dans la virulence des pathogènes a notamment été mise en évidence chez *M. tuberculosis*, où le transporteur d'asparagine AnsP2 y a été identifié. Ce transporteur, non essentiel à la croissance de *M. tuberculosis* en milieu synthétique, est nécessaire à la réplication dans les macrophages et les souris (Gouzy et al., 2014). De plus, AnsP2 a été décrit comme essentiel pour le métabolisme de l'azote durant l'infection et comme impliqué dans la mise en place de la défense contre l'acidification du phagosome. En effet, l'asparagine capté par AnsP2, est clivé par l'asparaginase AnsA, entraînant ainsi la production d'ammoniac, nécessaire au maintien du pH dans le phagosome (Gouzy et al., 2014).

Chez *F. tularensis*, des transporteurs d'acides aminés, di, tri et oligo peptides sont prédits à la fois dans les transporteurs actifs primaires (1 protéine) et secondaires (36 protéines) (voir tableau 13). Près de 60% des transporteurs d'acides aminés prédits ont été identifiés dans des cribles comme possédant un rôle dans la virulence de *F. tularensis*. Ces résultats illustrent donc bien le rôle important de l'adaptation nutritionnelle et notamment du point de vue du transport des acides aminés, dans la virulence des pathogènes intracellulaires.



**Tableau 13 :** Tableau des transporteurs d'acides aminés, di tri et oligo peptides prédits chez *Francisella tularensis* et de leur implication dans la virulence.

Famille de transporteurs	Nombre de transporteurs d'acides aminés prédits	Nombre de transporteurs identifiés dans des cribles	Cribles
Transporteurs actifs primaires			
ABC	1	1	(Asare et al., 2010; Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Su et al., 2007)
Transporteurs actifs secondaires			
MFS	10	8	(Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Kraemer et al., 2009; Maier et al., 2007; Moule et al., 2010; Weiss et al., 2007)
APC	11	5	(Asare et al., 2010; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Su et al., 2007; Weiss et al., 2007)
HAAAP	7	4	(Asare and Kwaik, 2010; Asare et al., 2010; Maier et al., 2007; Weiss et al., 2007)
POT	8	4	(Asare and Kwaik, 2010; Kraemer et al., 2009; Moule et al., 2010; Tempel et al., 2006)

#### b. Les transporteurs phagosomaux d'acides aminés

Les relations entre capture des acides aminés et virulence ont bien été mises en évidence chez *L.pneumophila*. Ce pathogène intracellulaire, responsable de la maladie du légionnaire, est capable d'infecter les macrophages alvéolaires pulmonaires. Son cycle de croissance intracellulaire débute par une entrée dans les macrophages via un processus de phagocytose

particulier. Par la suite, *L. pneumophila* inhibe la fusion phagosome/lysosome, via un système de sécrétion de type IV, transforme le phagosome en « Legionella-containing vacuole » (LCV) et s'y multiplie. La multiplication de la bactérie déclenche en 14h la rupture de la membrane plasmique cellulaire et la libération de *Legionella* dans le milieu extérieur. La multiplication de la bactérie se déroulant uniquement dans le phagosome du macrophage, la capture de nutriments dans ce compartiment cellulaire est donc essentielle à sa réplication. Peu de données sont connues quant aux nutriments présents dans le phagosome et la LCV, mais, plusieurs observations prédisent l'importance du transport d'acides aminés pour la croissance bactérienne. Dans les cellules, *Legionella* peut être présente sous deux formes. La première, observée dans un environnement nutritionnel favorable, est la forme répliquative, c'est à dire la forme dans laquelle la bactérie se multiplie. La seconde, appelée forme transmissible, est observable en conditions déplétées en nutriments. La différenciation de la forme répliquative en la forme transmissible, en conditions limitantes en nutriments, permet à la bactérie de favoriser sa transmission vers une nouvelle cellule hôte. Cette différenciation bactérienne en fonction des conditions environnementales garantit la survie et la multiplication de *Legionella*. C'est dans ce contexte qu'un mutant, appelé PhtA (pour phagosomal transporter A), a été identifié comme incapable de se différencier en forme répliquative dans des macrophages et comme exprimant de manière précoce des facteurs conduisant à la forme transmissive en milieu de culture (Sauer et al., 2005). Ce mutant semblait donc être, dans des conditions nutritionnelles carencées, incapable de se répliquer dans les LCV. De plus, le mutant dans le gène *phtA* a été identifié comme possédant un défaut de croissance, réversible par ajout de thréonine ou d'un dipeptide contenant la thréonine, à la fois en milieu synthétique et dans les macrophages. Pour terminer, des études de prédictions de séquence ont permis de mettre en évidence que le gène *phtA* encode un transporteur actif secondaire, de la famille des MFS. Ces recherches ont aussi permis de mettre en évidence que la souche *L. pneumophila* Philadelphia A possède 10 homologues de *phtA*, formant une nouvelle sous-famille de transporteurs MFS : les transporteurs phagosomaux ou Pht (Sauer et al., 2005). Cette étude a donc conduit à l'identification de PhtA, un transporteur de thréonine nécessaire à la multiplication et la différenciation de *L. pneumophila* dans les macrophages. D'autres études chez *L. pneumophila* ont identifié PhtJ, un transporteur de valine nécessaire à la réplication et à la différenciation dans les macrophages (Chen et al., 2008), ainsi que PhtC et PhtD, deux transporteurs contribuant à une protection de la bactérie contre la limitation en dTMP lors du cycle intracellulaire (Fonseca et al., 2014).

Des études bio-informatiques ont permis de mettre en évidence de nombreux paralogues du PhtA de *L. pneumophila* chez les bactéries, et plus précisément chez les *Alpha*- et *Gamma*-*proteobacteria* (Chen et al., 2008). Le nombre de paralogues retrouvés chez les différents organismes varie énormément (voir tableau 14). On retrouve 11 paralogues de Pht chez *L. pneumophila*, 10 chez *Coxiella burnetii*, 6 chez *Rickettsiella grylli*, 6 chez *Francisella tularensis* subsp *holarctica*, 4 chez *Wolbachia*, 2 chez *Anaplasma*, 2 chez *Ehrlichia*, 1 chez *Protochlamidia amoebophila*, 1 chez *Zymomonas mobilis* et 1 chez *Prochlorococcus marinus* (Chen et al., 2008). Ces transporteurs Pht sont donc exclusivement retrouvés chez les bactéries à multiplication intracellulaire (obligatoire ou facultative).

Ces 37 Pht prédits ont été classés dans 11 clusters différents, suggérant des transferts de gènes horizontaux. Cette hypothèse a été validée par l'étude comparée des pourcentages en G+C des séquences Pht par rapport au reste des génomes bactériens (voir tableau 14).

**Tableau 14 :** Membres de la famille des transporteurs Pht de *L. pneumophila* et *F. tularensis* classés par cluster phylogénique. D'après (Chen et al., 2008).

Gène	Organisme	Taille de la protéine (aa)	Division bactérienne
Cluster 1			
PhtD	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	427	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtC	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	423	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 2			
Ftu1	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>FTL_1673</i>	426	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtF	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	425	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtE	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	430	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 3			
PhtI	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	429	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 4			
Ftu2	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	396	<i>Gammaproteobacteria</i>

	<i>FTL_0931</i>		
PhtL	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Lens	429	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 6			
PhtB	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	435	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtK	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	421	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 7			
Ftu4	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>FTL_1647</i>	400	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ftu5	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>FTL_1645</i>	403	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 8			
Cluster 5			
Ftu3	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>FTL_0946</i>	401	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 9			
Ftu6	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> <i>FTL_1803</i>	434	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtG	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	432	<i>Gammaproteobacteria</i>
PhtJ	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	426	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 10			
PhtA	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	427	<i>Gammaproteobacteria</i>
Cluster 11			
PhtH	<i>Legionella pneumophila</i> subsp <i>pneumophila</i> Philadelphia 1	430	<i>Gammaproteobacteria</i>

L'implication dans la virulence des 6 transporteurs Pht prédits de *Francisella* (chacun identique à plus de 95 % d'une sous-espèce à l'autre et à environ 30 % avec les protéines Pht de *Legionella*) a été mise au jour lors de criblage de banques de mutants *in vitro* (hépatocytes ou macrophages) et *in vivo* (drosophile, souris) (voir tableau 15).

**Tableau 15** : Les transporteurs Pht de *F. tularensis*

SCHU S4	LVS	U112	Taille de la protéine	Identité entre les Pht	Pht ( <i>L.pneumophila</i> )	Références
FTT_0104c	FTL_1673	FTN_1611	426	98,4 %	PhtD (27%)	1, 2
FTT_0056c	FTL_1803	FTN_1654	434	99,3 %	PhtJ (33,3%)	3, 4, 5, 6
FTT_0671	FTL_0946	FTN_1011	428	97,9 %	PhtC (27%)	7
FTT_0053	FTL_1806	FTN_1657	432	99,5 %	PhtJ (31,9%)	4, 6
FTT_0129	FTL_1645	FTN_1586	437	100 %		3, 7, 8
FTT_0127c	FTL_1647	FTN_1588	400	96,3 %		2

1 : (Asare and Kwaik, 2010) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* Drosophiles

2 : (Kraemer et al., 2009) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* souris C57Bl6

3 : (Qin and Mann, 2006) *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4, crible *in vitro* HepG2

4 : (Weiss et al., 2007) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* souris

5 : (Peng and Monack, 2010) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* poumons de souris

6 : (Moule et al., 2010) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* Drosophiles

7 : (Asare et al., 2010) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vivo* Drosophiles

8 : (Llewellyn et al., 2011) *F. tularensis* subsp *novicida*, crible *in vitro* macrophages primaires murins

Une étude systématique par mutagenèse dirigée, des gènes codant pour les Pht prédits de *F. holarctica* LVS, a été publiée au cours de mon projet. Ces recherches réalisées dans le but d'identifier des souches potentiellement vaccinales, ont permis de mettre en évidence une altération de la virulence de Francisella lors de la mutation de deux transporteurs, codés par les gènes *FTN\_1586* et *FTN\_1654* (Marohn et al., 2012). De plus, ces mutants ont été identifiés comme étant en mesure de conférer une protection à la souris face à une dose létale de *F. holarctica*. Cependant, l'approche systématique de cette recherche, n'a pas permis d'en savoir plus sur la fonction de ces transporteurs dans la virulence de la bactérie.

## Objectifs :

Ce travail de thèse qui fait l'objet des deux articles présentés ci-après, vise à illustrer l'importance de la nutrition, et plus spécifiquement du transport des acides aminés, dans la virulence de *F. tularensis*.

Aucun transporteur d'acides aminés n'ayant été jusqu'alors identifié comme jouant un rôle dans la virulence de *F. tularensis*, nous avons choisi d'étudier une sous-famille de transporteurs MSF, la sous-famille des Pht. Ces transporteurs prédits comme participant au transport des acides aminés chez *F. tularensis*, ont déjà été identifiés comme nécessaires à la multiplication phagosomale d'un autre pathogène intracellulaire : *L. pneumophila*.

Notre objectif premier était d'identifier les transporteurs Pht impliqués dans la pathogénicité et/ou la croissance de la bactérie. Pour cela, j'ai inactivé individuellement chacun des gènes codant pour un transporteur Pht prédit. J'ai ensuite caractérisé ces mutants pour leurs capacités de croissance en milieu minimum et de multiplication dans les macrophages murins J774. Ce crible a permis de mettre en avant deux candidats : un premier, correspondant à la délétion du gène *FTN\_1586* et présentant un fort défaut de multiplication dans les macrophages ; un second, correspondant à la délétion du gène *FTN\_1654*, présentant un défaut de croissance en milieu minimum.

Notre second objectif a été la caractérisation fonctionnelle, des capacités de transport et d'implication dans la virulence nutritionnelle, de chacun de ces deux mutants. Les résultats de ces recherches sont présentés dans la seconde partie de mon manuscrit sous la forme de deux articles, l'un publié dans le journal Cellular microbiology et l'autre actuellement soumis.



## Résultats



## L'asparagine : Un acide aminé requis pour la virulence et la dissémination de *F. tularensis*

Dans cette première partie de mon travail expérimental, nous nous sommes intéressés à la protéine FTN\_1586 (désignée AnsP), un transporteur prédit d'acides aminés de la sous-famille Pht.

L'importance de la protéine AnsP dans la virulence des différentes sous-espèces de *Francisella* a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Asare et al., 2010; Marohn et al., 2012; Qin and Mann, 2006). *In vitro*, l'inactivation du gène *ansP* chez les souches SCHU S4, LVS ou U112 entraîne une diminution de la multiplication intracellulaire dans les cellules HepG2, les macrophages primaires murins et les macrophages murins J774 (Marohn et al., 2012; Qin and Mann, 2006). *In vivo*, l'inactivation du gène *ansP* entraîne une diminution de la virulence des souches U112 et LVS dans les drosophiles et la souris BALB/c (Asare et al., 2010; Marohn et al., 2012).

Nos travaux ont permis de montrer que le défaut de multiplication cytosolique, ainsi que le défaut de virulence *in vivo*, d'un mutant dans le gène codant pour AnsP, était réversible par ajout d'asparagine en excès, un acide aminé non essentiel pour la croissance de la bactérie en milieu synthétique. Des expériences de transport sur le mutant délété pour le gène *ansP* ont mis en évidence un double déficit dans le transport de l'asparagine et de l'aspartate.

La protéine AnsP assure donc le transport de l'asparagine, un acide aminé dont les besoins varient en fonction de l'environnement nutritionnel de la bactérie. Lors de sa croissance en milieu synthétique, la bactérie est prototrophe pour l'asparagine. A l'inverse, dans le cytosol de la cellule infectée, la bactérie devient auxotrophe pour l'asparagine et doit donc en capter afin de se multiplier. Ce travail illustre bien les différentes modifications métaboliques que réalisent les bactéries lors de l'infection de cellules. En effet, le changement de l'environnement nutritionnel de la bactérie, lorsque celle-ci se trouve dans le cytoplasme eucaryote, conduit à une adaptation nutritionnelle aussi bien du point de vue des voies de biosynthèse que des capacités de transport. Dans notre cas, l'adaptation joue sur la voie d'obtention de l'asparagine par *Francisella*. D'une biosynthèse endogène lors de la culture en milieu liquide, *Francisella* passe, dans le cadre de l'infection, à une captation via un transporteur secondaire.

# Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella*

Gael Gesbert,<sup>1,2</sup> Elodie Ramond,<sup>1,2</sup> Mélanie Rigard,<sup>3,4</sup> Eric Frapy,<sup>1,2</sup> Marion Dupuis,<sup>1,2</sup> Iharilalao Dubail,<sup>1,2</sup> Monique Barel,<sup>1,2</sup> Thomas Henry,<sup>3,4</sup> Karin Meibom<sup>1,2</sup> and Alain Charbit<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Bâtiment Leriche, 96 rue Didot 75993, Paris, Cedex 14, France.

<sup>2</sup>INSERM, U1002, Unité de Pathogénie des Infections Systémiques, Paris, France.

<sup>3</sup>Université de Lyon, Lyon, France.

<sup>4</sup>Bacterial Pathogenesis and Innate Immunity Laboratory, INSERM U851 'Immunity, Infection and Vaccination', Lyon, France.

## Summary

In order to develop a successful infectious cycle, intracellular bacterial pathogens must be able to adapt their metabolism to optimally utilize the nutrients available in the cellular compartments and tissues where they reside. *Francisella tularensis*, the agent of the zoonotic disease tularaemia, is a highly infectious bacterium for a large number of animal species. This bacterium replicates in its mammalian hosts mainly in the cytosol of infected macrophages. We report here the identification of a novel amino acid transporter of the major facilitator superfamily of secondary transporters that is required for bacterial intracellular multiplication and systemic dissemination. We show that inactivation of this transporter does not affect phagosomal escape but prevents multiplication in the cytosol of all cell types tested. Remarkably, the intracellular growth defect of the mutant was fully and specifically reversed by addition of asparagine or asparagine-containing dipeptides as well as by simultaneous addition of aspartic acid and ammonium. Importantly, bacterial virulence was also restored *in vivo*, in the mouse model, by asparagine supplementation. This work unravels thus, for the first time, the importance of asparagine for cytosolic

multiplication of *Francisella*. Amino acid transporters are likely to constitute underappreciated players in bacterial intracellular parasitism.

## Introduction

*Francisella tularensis* is a Gram-negative bacterium causing the zoonotic disease tularaemia in a large number of wildlife animal species and has one of the broadest host range than any other known zoonotic disease-causing organism (Sjöstedt, 2011). Rodents, lagomorphs and amoebae are thought to be the main reservoirs for human contamination (Keim *et al.*, 2007). This highly infectious pathogen can be transmitted to humans in numerous ways, including direct contact with sick animals, inhalation, ingestion of contaminated water or food or by insect bites. Four different subspecies (subsp.) of *F. tularensis* that differ in virulence and geographic distribution exist, designated subsp. *tularensis*, *holarctica*, *novicida* and *mediasiatica* respectively. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies causing a severe disease in humans (Sjöstedt, 2007) and is considered a potential bioterrorism agent (Oyston *et al.*, 2004). *F. tularensis* subsp. *novicida* (or *F. novicida*) is considered non-pathogenic for humans but is fully virulent for mice and is widely used as a model to study highly virulent subspecies.

*Francisella* is able to survive and to replicate inside a variety of mammalian host cells and in particular, macrophages (Hall *et al.*, 2008). Its virulence is tightly linked to its ability to escape rapidly from the phagosome into the host cytosol (Santic *et al.*, 2008) where it can replicate actively (Chong and Celli, 2010).

Several recent studies, mainly based on the characterization of nucleic acid and amino acid auxotrophic mutants, support the importance of metabolism in *Francisella* pathogenesis. For example, utilization of uracil has been shown to be required for inhibition of the neutrophil respiratory burst and intra-macrophage survival (Schulert *et al.*, 2009). Uracil auxotroph mutants of *F. tularensis* LVS showed impaired phagosomal escape and severe multiplication defects in monocyte-derived macrophages. The mutant bacteria that could reach the cytosol were unable to replicate but still triggered the secretion of IL-8 and IL-1 $\beta$ . Remarkably, in J774 and

Received 11 September, 2013; revised 10 October, 2013; accepted 11 October, 2013. \*For correspondence. E-mail alain.charbit@inserm.fr; Tel. (+33) 1 72 60 65 11; Fax (+33) 1 72 60 65 13.

HepG2 cells, these uracil auxotrophs appeared to multiply normally, implying that the defects in the pyrimidine biosynthetic pathway affect *Francisella* virulence in a cell type-specific manner. More recently, Peng and Monack showed that tryptophan auxotrophs of *F. novicida* were severely affected in intracellular multiplication and were attenuated in the mouse model (Peng and Monack, 2010).

Additional metabolic pathways have been shown to contribute to *Francisella* pathogenesis, including gluconeogenesis and glycolysis (Meibom and Charbit, 2010a) as well as biotin biosynthesis (Napier *et al.*, 2012).

The identification of bacterial attributes specifically required for cytosolic replication by *Francisella* in the host cytosol may prove technically complex and time-consuming (Celli and Zahrt, 2013). Remarkably, two genome-scale screens, reported in human macrophages and *Drosophila*-derived cells (Asare and Abu Kwaik, 2010; Asare *et al.*, 2010), identified more than 90 mutants that showed deficient phagosomal escape. These included genes encoding proteins with a broad variety of predicted functions. To date the best functionally characterized genes include: (i) purine biosynthetic genes (Pechous *et al.*, 2006; 2008), (ii) the  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase gene *ggt* (Alkhuder *et al.*, 2009) and (iii) several genes of still unknown biological function, such as *dipA* (Wehrly *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2012), *FTT0989* (Brotcke *et al.*, 2006) and *ripA* (Fuller *et al.*, 2008; Mortensen *et al.*, 2012).

Earlier genome-scale genetic screens, aimed at identifying specific *Francisella* intracellular survival attributes, have also repeatedly identified genes encoding membrane proteins. These included notably putative amino acid transporters (Pechous *et al.*, 2009; Meibom and Charbit, 2010b), highlighting the potential critical role of such nutrient acquisition systems in intracellular adaptation of *Francisella*. However, there is currently no functional or structural information available on any of these hypothetical transporters.

The *Francisella* genomes encode numerous predicted transport systems, the majority of which are secondary carriers (Meibom and Charbit, 2010a). Secondary transporters encompass several major families, including the major facilitator superfamily (MFS), involved in various functions including drug efflux, sugar and amino acid uptake (Reddy *et al.*, 2012). Of particular interest, in the pathogenic intracellular bacterium *Legionella pneumophila* (Sauer *et al.*, 2005), a MFS threonine transporter, designated PhtA (for Phagosomal transporter A), was shown to be required for intraphagosomal growth and differentiation. Phylogenetic analyses revealed that the *Legionella* genomes encode numerous Pht paralogues (Sauer *et al.*, 2005). Importantly, Pht family members

were also found in other bacterial species (Chen *et al.*, 2008) but exclusively among intracellular pathogenic bacteria.

Remarkably, *Francisella*, which resides only transiently in a phagosomal compartment and multiplies exclusively in the cytosol of infected cells, also encodes several putative Pht orthologues (four to six, depending on the e value threshold chosen for the blast analysis; Sauer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). Recently, a study aimed at developing anti-*Francisella* vaccines (Marohn *et al.*, 2012), showed that inactivation of several of these putative transporters had altered intracellular replication kinetics and attenuation of virulence in mice in *F. tularensis* LVS (including the orthologue of *ansP* in *F. tularensis* LVS, see below). However, none of them has been functionally characterized yet and their substrate specificity is currently unknown.

In the present work, we addressed the functional role of one of these transporters, hereafter designated AnsP, which has been repeatedly identified by earlier genetic screens, in different *Francisella* subspecies and using a variety of different screening procedures. We demonstrate that the MFS transporter AnsP is required for bacterial multiplication in the cytosolic compartment of infected macrophages and for systemic dissemination in the mouse.

## Results

### *AnsP, a member of the major facilitator superfamily of secondary transporters*

The region of gene *ansP* (Fig. S1) is highly conserved in all the *Francisella* genomes sequenced thus far and the AnsP protein of *F. novicida* (FTN\_1586, 437 amino acids in length) shares more than 99% identity with its orthologues in *F. tularensis* subsp. *holartica* (FTL\_1645), *mediasiatica* (FTM\_0191) and *tularensis* (FTT\_0129) (Fig. S2). In contrast, the homologues of the *Francisella* AnsP protein in other bacterial species do not exceed 28% amino acid identity. Indeed, the closest homologue in *L. pneumophila* (PhtE) shares only 26.7% amino acid identity, suggesting that the *Francisella* AnsP proteins displays properties specific to *Francisellae* species. Secondary structure prediction predicts that, like all MFS family members, AnsP comprises 12 transmembrane helices (not shown).

Remarkably, the *ansP* gene was found among the genes required for replication of *F. novicida* (FTN\_1586) in RAW264.7 macrophages (Llewellyn *et al.*, 2011) as well as involved in replication in both U937 macrophages and *drosophila* S2 cells (Asare and Abu Kwaik, 2010). The orthologue of *ansP* in *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (FTT\_0129) has also been found to be required

for normal bacterial replication in the hepatocytic human cell line HepG2 (Qin and Mann, 2006). These screening results imply that the transporter AnsP has specific properties that are not compensated by any other putative transporter encoded by the *Francisella* genome in cells as well as *in vivo*. In this respect, it is worth mentioning that the other predicted Pht family members of *Francisella* share less than 27% amino acid identity with AnsP (and in most cases, also between each other).

#### Role of AnsP in *Francisella* intracellular survival

We constructed a chromosomal deletion of the *ansP* gene in *F. novicida* (FTN\_1586) by allelic replacement (Lauriano *et al.*, 2003). We first evaluated the possible impact of the mutation *in vitro* (using different media and growth conditions) and then followed the capacity of the mutant to infect and multiply in different cell types as well as *in vivo*, in the mouse model.

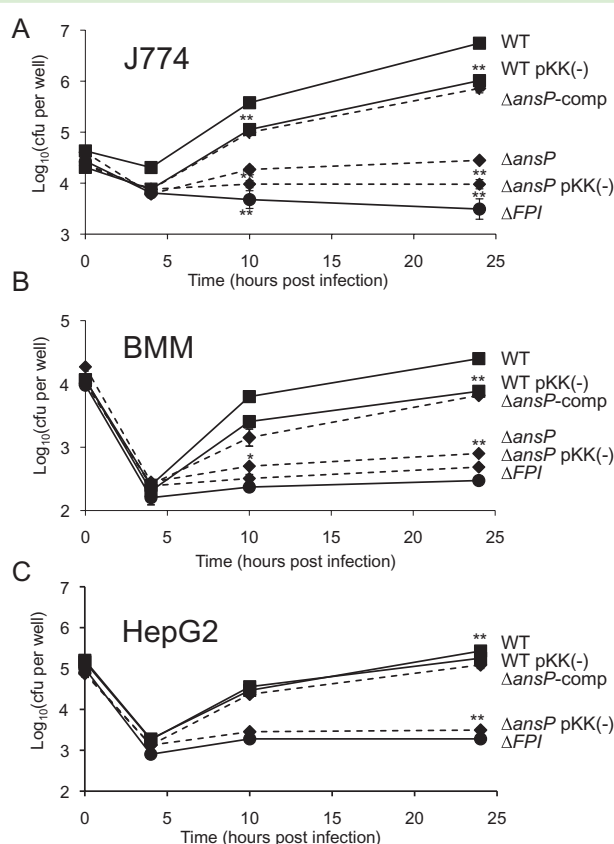
#### *AnsP* is not required for growth in broth

Inactivation of *ansP* had no impact on bacterial growth in broth and did not prevent acquisition of any of the essential amino acid present in Chemically defined minimal medium (CDM<sub>min</sub>; Fig. S3). We used Biolog Phenotypic Microarray GNII plates to test possible metabolic defects of the  $\Delta ansP$  mutant. The respiration pattern obtained with the  $\Delta ansP$  and wild-type strains were identical, indicating that the mutation had not led to a defect in the utilization of any of the 96 carbon sources tested (Fig. S4).

#### *AnsP* is essential for intracellular bacterial multiplication

Quantitative RT-PCR analysis demonstrated that inactivation of the *ansP* gene (in a  $\Delta ansP$  deletion strain, see below) had no impact on the transcription of the two flanking genes FTN\_1585 and FTN\_1587 (Fig. S1). To further confirm that inactivation of the *ansP* gene had no polar effect on downstream gene expression, we complemented the  $\Delta ansP$  mutant strain with a plasmid-encoded copy of the wild-type *ansP* gene under *pgro* promoter control (see *Experimental procedures* for details).

We examined the ability of wild-type *F. novicida* (WT),  $\Delta ansP$  and  $\Delta ansP$ -complemented strains to survive and multiply in: (i) murine macrophage-like J774 cells, (ii) primary murine bone marrow-derived macrophages (BMM) and (iii) human hepatocytic HepG-2 cells (Fig. 1). Remarkably, the  $\Delta ansP$  mutant showed a severe growth defect in all cell types tested. In J774 cells, the  $\Delta ansP$  mutant showed a 10-fold reduction of intracellular bacteria after 10 h, and almost a 100-fold reduction after 24 h, as compared to wild-type *F. novicida* (Fig. 1A). In

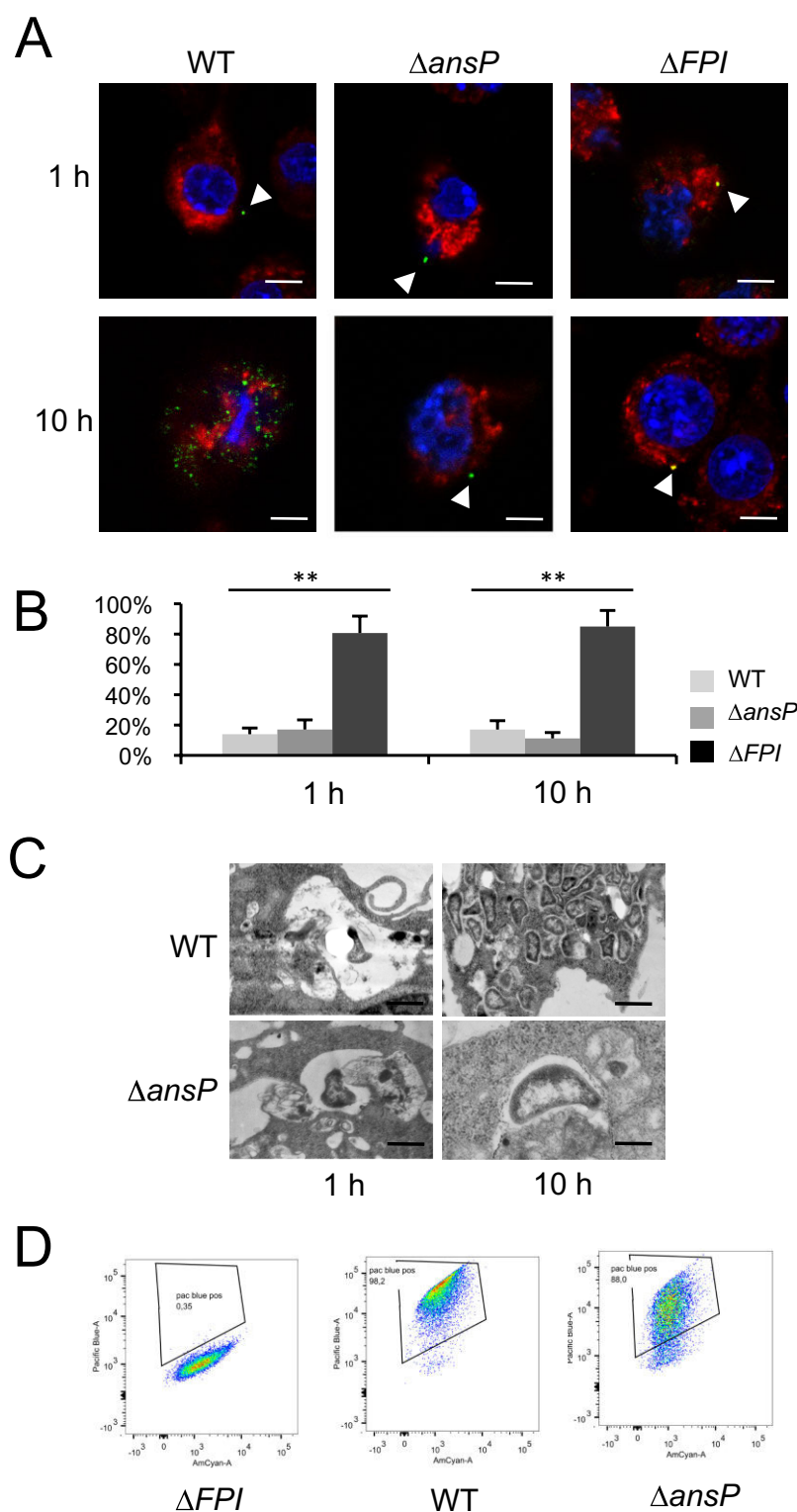


**Fig. 1.** The  $\Delta ansP$  mutant is defective for intracellular replication. The  $\Delta ansP$  mutant failed to replicate in J774 murine macrophage-like cells (A), murine bone marrow-derived macrophages (BMM) (B) and human hepatocytic cell line HepG2 (C). In all cell types, constitutive expression of the wild-type gene *ansP* (carried on *pKK-pgro-ansP*) restored normal intracellular replication. WT, wild-type *F. novicida*; WT pKK(-), WT carrying pKK214;  $\Delta ansP$ , WT deleted from gene *ansP*;  $\Delta ansP$  pKK(-),  $\Delta ansP$  strain carrying pKK214;  $\Delta ansP$ -comp,  $\Delta ansP$  carrying pKK214-*pgro-ansP*; and  $\Delta FPI$ , wild-type *F. novicida* deleted of the entire FPI. Intracellular replication was monitored by enumerating colony-forming units (cfu) on chocolate agar plates. Each experiment was performed in triplicate. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  (as determined by Student's *t*-test).

BMM, the  $\Delta ansP$  mutant showed an eightfold reduction of intracellular bacteria after 10 h, and a 16-fold reduction after 24 h (Fig. 1B). Finally, in HepG-2 cells, the  $\Delta ansP$  mutant showed a 10-fold reduction of intracellular bacteria after 10 h, and a 70-fold reduction after 24 h (Fig. 1C).

In all cell types tested, the intracellular growth defect of  $\Delta ansP$  mutant was similar to that observed with a deletion of the entire *Francisella* pathogenicity island [the  $\Delta FPI$  mutant (Weiss *et al.*, 2007)]. Introduction of the complementing plasmid (pKK214-*pgro-ansP*) restored bacterial viability to same level as in the wild-type parent, confirming the specific involvement of gene *ansP* in intracellular survival.





**Fig. 2.** Subcellular localization of the  $\Delta ansP$  mutant.

A and B. Confocal microscopy. J774 cells were incubated for 1 h with wild-type *F. novicida*,  $\Delta ansP$  or  $\Delta FPI$  strains and their colocalization with the phagosomal marker LAMP1 was observed by confocal microscopy. The phagosomes of J774 cells were labelled with anti-LAMP1 antibody (1/100 final dilution). Cell nuclei were labelled with DAPI. Bacteria were labelled with primary mouse monoclonal antibody anti-*F. novicida* (1/500 final dilution). (A) The colour images represent wild-type *F. novicida* (WT),  $\Delta ansP$ ,  $\Delta FPI$  strains (green); phagosomes (red); and nuclei (blue). Scale bars at the bottom right of each panel correspond to 10  $\mu$ M. (B) Quantification of bacteria/phagosome colocalization at 1 h, 4 h and 10 h for WT,  $\Delta ansP$  and  $\Delta FPI$  strains.  $**P < 0.01$  (as determined by Student's *t*-test).

C. Electron microscopy. J774 cells were incubated for 1 h or 24 h with wild-type *F. novicida* (WT) or  $\Delta ansP$  mutant strains and replication was observed by transmission electronic microscopy ( $\times 20\,000$  for WT and  $\Delta ansP$  at 1 h,  $\times 27\,000$  for  $\Delta ansP$  at 24 h and  $\times 14\,000$  for WT at 24 h). After 10 h, active intracellular multiplication is observed in J774 macrophages infected with WT. In contrast, no multiplication is visible in most of the macrophages infected with the  $\Delta ansP$  mutant. The scale bars at the bottom right of the two left panels correspond to 400 nm (1 h); and to 600 nm (WT) and 200 nm ( $\Delta ansP$ ), respectively, for the two right panels (10 h). D. CCF4. The cytosol of bone marrow-derived infected macrophages was loaded with CCF4. Upon cleavage by cytosolic  $\beta$ -lactamase, the CCF4 FRET is lost leading upon excitation at 405 nm to a shift of fluorescence from green (535 nm) to blue (450 nm). *F. novicida* naturally express a  $\beta$ -lactamase able to cleave the CCF4. *F. novicida* escape into the host cytosol is thus associated with a shift of the CCF4 probe from green to blue. Upon infection (at a multiplicity of infection of 100) with wild-type *F. novicida* (WT) and  $\Delta ansP$  mutant, 98% and 88% of Pacific blue-positive cells were recorded respectively. In contrast, less than 1% of the cells were positive when infected with the  $\Delta FPI$  mutant.

#### Subcellular localization of the $\Delta ansP$ mutant in infected macrophages

We used the differential solubilization process previously described (Barel *et al.*, 2010) to follow the subcellular

localization of the  $\Delta ansP$  mutant in infected cells (Fig. 2A and B). Briefly, the plasma membrane was selectively permeabilized with digitonin. This treatment allowed the detection of cytoplasmic bacteria and proteins. Subsequent treatment with saponin rendered intact

phagosomes accessible to antibodies and allowed detection of intra-phagosomal bacteria. Intracellular localization of the bacteria or LAMP-1 (used as a specific marker of phagosomes) was analysed using specific antibodies and their colocalization was monitored at two time points (1 h and 10 h post-infection; Fig. 2A). Quantification of each colocalization was performed with the Image J software (Fig. 2B).

With both wild-type *F. novicida* and the  $\Delta ansP$  mutant, colocalization with LAMP-1 was only around 15% after 1 h and remained in the same range throughout the infection. In contrast, for the  $\Delta FPI$  mutant strain, 80% of bacteria colocalized with LAMP-1 after 1 h and colocalization remained very high after 10 h (85%). These results strongly suggest that the capacity of the  $\Delta ansP$  mutant to escape rapidly from the phagosomal compartment is unaffected.

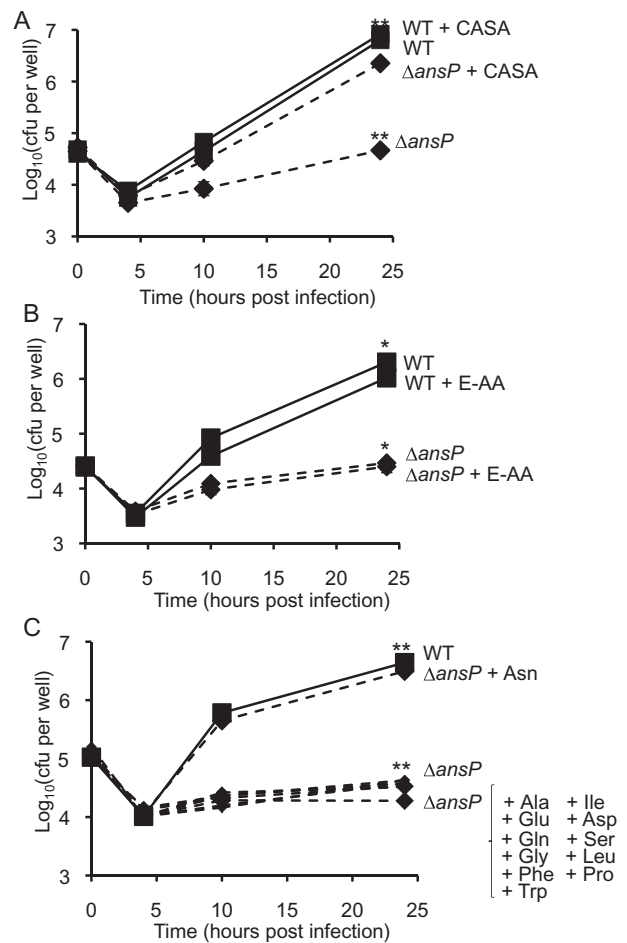
To confirm these results, we performed thin section electron microscopy of J774 cells infected either with wild-type *F. novicida* or with the  $\Delta ansP$  mutant (Fig. 2C). Significant bacterial replication was observed in the cytosol of most infected cells 10 h post-infection with wild-type *F. novicida*. In contrast, bacterial multiplication was severely impaired in cells infected with the  $\Delta ansP$  mutant.

Finally, to quantify phagosomal permeabilization following *F. novicida* infection, we used the CCF4/ $\beta$ -lactamase technique originally described by Enninga and collaborators (Nothelfer *et al.*, 2011), which we recently adapted to *F. novicida* (Juruj *et al.*, 2013). Briefly, macrophages were loaded with CCF4, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe retained within the host cytosol following the action of host cytosolic esterases. When cleaved by  $\beta$ -lactamase, the CCF4 FRET is lost leading upon excitation at 405 nm to a shift of fluorescence from green (535 nm) to blue (450 nm). *F. novicida* naturally express a  $\beta$ -lactamase able to cleave the CCF4 substrate (Broms *et al.*, 2012). The phagosome permeabilization or *F. novicida* escape into the host cytosol is thus associated with a shift of the CCF4 probe from green to blue. Using this sensitive assay, we could not detect any differences in term of phagosomal permeabilization/vacuolar escape at 1 h post-infection (PI) in BMM between wild-type *F. novicida* and the  $\Delta ansP$  mutant (Fig. 2D). As expected (Juruj *et al.*, 2013), we did not detect phagosomal permeabilization using a  $\Delta FPI$  mutant.

This result confirms thus that the  $\Delta ansP$  mutant has normally access to the host cytosol but fails to multiply normally within this compartment.

#### Nutritional requirement of the $\Delta ansP$ mutant

Since AnsP belongs to a family of putative amino acid transporters, we hypothesized that the intracellular multiplication defect of the  $\Delta ansP$  mutant might be alleviated



**Fig. 3.** Amino acid supplementation. Intracellular multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant was partially rescued by addition of casamino acids (CASA) and fully rescued by the addition of non-essential amino acids (NE-AA). In contrast, the addition of essential amino acids fails to restore growth. (A) J774 cells supplemented with CASA (5 g l<sup>-1</sup> final concentration); (B) J774 cells supplemented with a pool of essential amino acid (E-AA); (C) J774 cells supplemented individually either with the useful but non-essential amino acid (UNE-AA) isoleucine (Ile), aspartic acid (Asp), serine (Ser), leucine (Leu), proline (Pro); or with the non-essential amino acid (NE-AA) alanine (Ala), asparagine (Asn), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), glycine (Gly), phenylalanine (Phe), tryptophane (Trp), each at 3 mM final concentration. E-AA pool: equimolecular mixture of arginine, histidine, lysine, methionine, tyrosine, cysteine, each at 3 mM final concentration. Intracellular replication was monitored by enumerating colony-forming units (cfu) on chocolate agar plates. Each experiment was performed in triplicate.

by amino acid supplementation (Fig. 3). Therefore, we first compared the kinetics of multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant in J774 macrophages, in the presence or absence of casamino acids in the cell culture medium (Fig. 3A). Addition of 0.5% casamino acids restored multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant to the wild-type level.

This result suggested that AnsP might be an amino acid transporter whose function can be bypassed by other amino acids or peptide permeases.

We then reasoned that the substrate of AnsP could be deduced by further identifying the amino acid(s) responsible for this supplementation. For this, we tested the capacity of pools of amino acids to restore wild-type intracellular multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant in J774 macrophages. Supplementation with a pool of six amino acids essential for growth in CDM did not improve intracellular multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant (Fig. 3B). In contrast, a pool of seven amino acids (alanine, glutamate, glutamine, glycine, phenylalanine, tryptophane and asparagine), non-essential for growth in CDM (and, thus, not present in the CDM), restored wild-type intracellular multiplication to the  $\Delta ansP$  mutant (not shown).

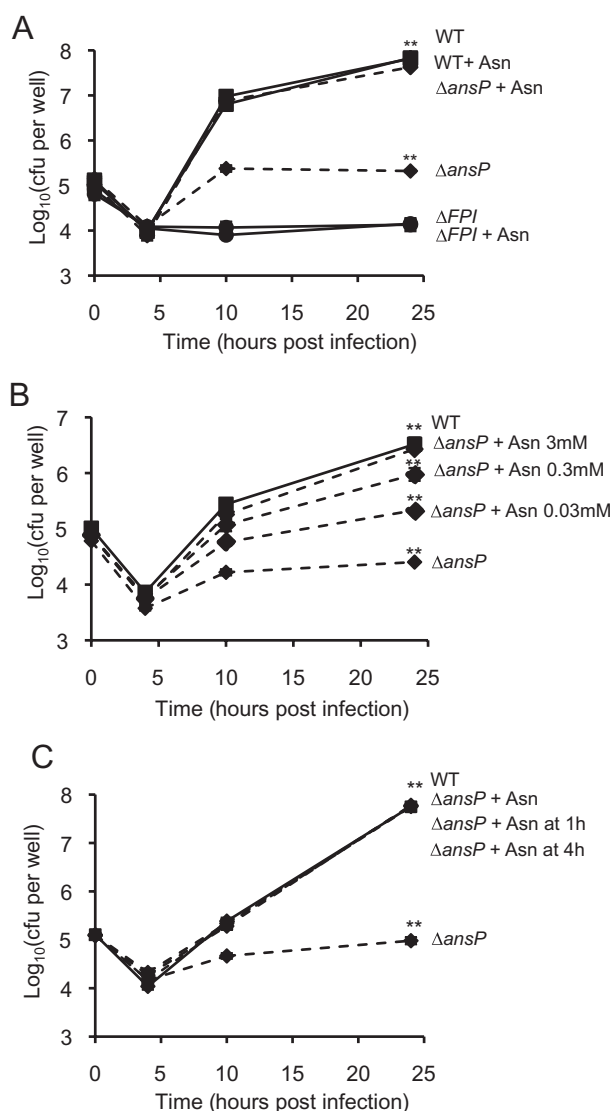
As mentioned above, the  $\Delta ansP$  mutant was able to grow like wild-type *F. novicida* in CDM<sub>min</sub> (Fig. S3). This implies that: (i) the AnsP protein is not required for the capture of the amino acid present in the CDM<sub>min</sub>, and (ii) that the amino acid(s) that is (are) not required for growth of the  $\Delta ansP$  mutant in CDM, become(s) essential for growth in cells. Finally, each of the remaining amino acids (i.e. from the non-essential and useful but non-essential pools) was tested individually (Fig. 3C). These assays demonstrated that only asparagine was capable of supplementing the defect of the  $\Delta ansP$  mutant.

#### *AnsP is an asparagine transporter required for intracellular multiplication*

The multiplication defect of the  $\Delta ansP$  mutant was specifically and totally restored by asparagine supplementation whereas the intracellular defect of the  $\Delta FPI$  mutant (Weiss *et al.*, 2007) was not improved by asparagine supplementation (Fig. 4A).

To further assess the specificity of the AnsP transporter, we tested whether the growth defect suppression by free asparagine was dose-dependent (Fig. 4B). Supplementation with asparagine at a final concentration of 0.03 mM failed to completely restore bacterial multiplication in infected J774 cells (the initial DMEM cell culture medium is devoid of asparagine). Indeed, after 24 h, growth of the  $\Delta ansP$  mutant was improved 10-fold as compared to growth without asparagine, but was still 15-fold lower than that of the parental strain. Supplementation with 0.3 mM asparagine, significantly improved intracellular multiplication of the mutant but this was still fivefold lower than that of the wild-type strain after 24 h. In contrast, addition of 3 mM asparagine restored wild-type multiplication levels.

The fact that the  $\Delta ansP$  mutant showed no apparent defect in phagosomal escape prompted us to test the impact of supplementation with asparagine (3 mM) at later times during the infection of J774 macrophages. Therefore, we supplemented the  $\Delta ansP$  mutant with asparagine after 1 h or after 4 h of infection (i.e. when the mutant bacteria are in the cytosolic compartment but fail



**Fig. 4.** Intracellular multiplication of the mutant  $\Delta ansP$  is fully and specifically rescued by addition of asparagine.

A. When DMEM was supplemented with 3 mM asparagine (Asn), intracellular growth of the  $\Delta ansP$  mutant was identical to that of wild-type U112. In contrast, asparagine supplementation had no effect on the  $\Delta FPI$  mutant ( $\Delta FPI$ ).

B. When DMEM was supplemented with 0.03 mM or 0.3 mM Asn, growth of the  $\Delta ansP$  mutants was only partially restored.

C. When DMEM was supplemented with 3 mM asparagine (Asn), after 1 h of infection, intracellular growth of the  $\Delta ansP$  mutant was restored to wild-type levels, at 10 h and 24 h. The same complete restoration of multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant was observed when DMEM was supplemented with asn, after 4 h of infection.

\*\* $P < 0.01$  (as determined by Student's *t*-test).

to multiply normally). Remarkably, in both conditions, multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant was restored to wild-type levels already at 10 h and remained similar to the wild-type strain after 24 h (Fig. 4C).

These results thus confirmed that the multiplication defect of the  $\Delta ansP$  mutant is due to an asparagine

uptake defect when the bacteria are present in the cytosolic compartment of infected cells.

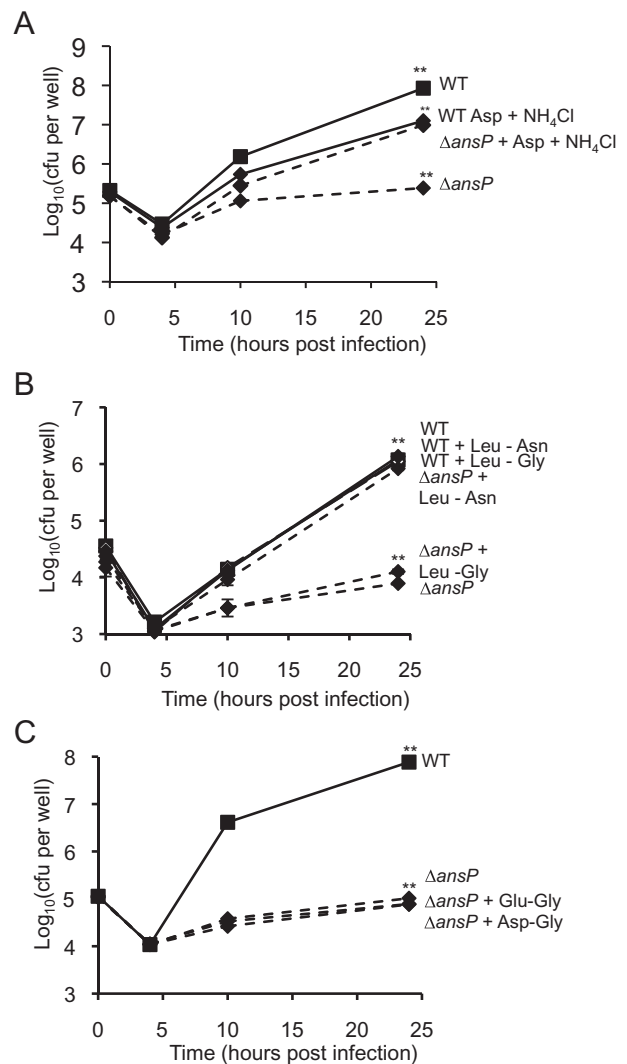
We then tested whether the addition of aspartic acid and/or a source of ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) would also restore intracellular growth of the mutant. In order to avoid a possible inhibitory effect on phagosomal escape,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added only 4 h after infection. Strikingly, only the simultaneous addition of both aspartic acid (3 mM) and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mM) restored wild-type intracellular multiplication to the  $\Delta\text{ansP}$  mutant (Fig. 5A), implying either that aspartic acid and ammonium serve as substrates for the production of asparagine or, conversely, that asparagine serves as a source of aspartic acid and ammonium.

Finally, to test whether asparagine-containing dipeptides could also bypass AnsP function, we followed the kinetics of intracellular multiplication of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant in J774 macrophages supplemented with either Leu–Asn or Leu–Gly dipeptides (3 mM). The asparagine-containing peptide restored wild-type multiplication of the mutant, but the Leu–Gly peptides did not (Fig. 5B). This assay confirmed thus the specific asparagine requirement of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant for intracellular growth. As additional controls, we tested two dipeptides containing either glutamate (Glu–Gly) or aspartic acid (Asp–Gly). None of them compensated the multiplication defect of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant (Fig. 5C).

We also constructed a chromosomal deletion mutant ( $\Delta\text{FTL}_{1645}$ ) in *F. tularensis* LVS and evaluated its impact on intracellular growth. Similar to our findings with *F. novicida*, the *F. tularensis* LVS  $\Delta\text{FTL}_{1645}$  mutant had a defect in intracellular multiplication in macrophages (Fig. S5). In J774 cells, the  $\Delta\text{ansP}$  mutant of LVS showed a fourfold reduction of intracellular bacteria after 24 h, and an 11-fold reduction after 48 h, as compared to the parental LVS strain. Remarkably, as in *F. novicida*, upon supplementation of the culture media with asparagine (3 mM), the  $\Delta\text{FTL}_{1645}$  mutant multiplied with wild-type kinetics. These results strongly support the conserved role of AnsP among *Francisella* species.

#### *AnsP transports both aspartic acid and asparagine*

Since asparagine is the amide derivative of aspartic acid, we reasoned that AnsP might also be involved in the transport of aspartic acid. We therefore first compared the uptake of radiolabelled aspartic acid ( $^{14}\text{C}$ -Asp) by wild-type *F. novicida* to that of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant. The wild-type strain incorporated  $^{14}\text{C}$ -Asp more rapidly than the  $\Delta\text{ansP}$  mutant, at 10  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Asp (Fig. 6A). However, aspartic acid incorporation was only partially affected in the  $\Delta\text{ansP}$  mutant, at all time points tested. This prompted us to evaluate the impact of *ansP* inactivation in a broad range of aspartic acid concentrations (Fig. 6B). At all the con-



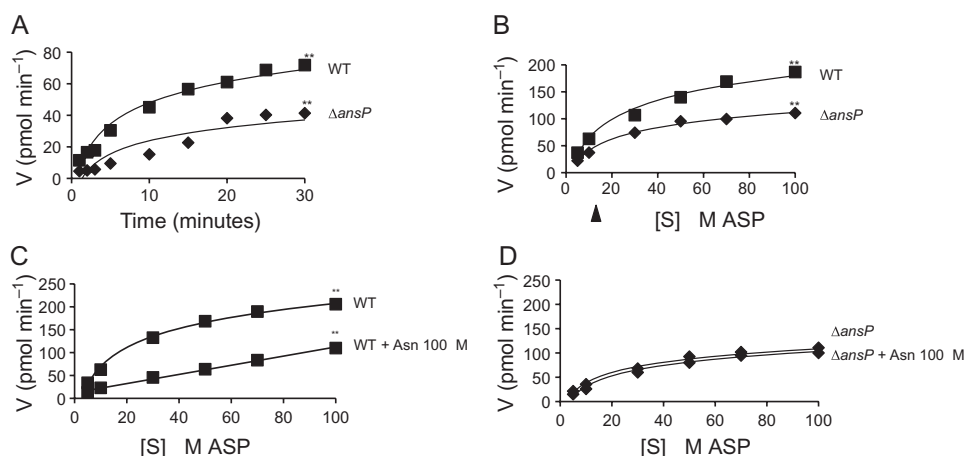
**Fig. 5.** Intracellular multiplication is restored by simultaneous addition of aspartic acid + ammonium or an asparagine-containing dipeptide.

A. The simultaneous addition of aspartic acid and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  restored wild-type intracellular multiplication of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant at all time points; whereas the separate supplementation with either aspartic acid (see Fig. 3C) or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (not shown) had no effect. B and C. (B) Supplementation with the asparagine-containing dipeptide leucine–asparagine (Leu–Asn) also fully restored intracellular growth of  $\Delta\text{ansP}$ . In contrast, supplementation with the dipeptides leucine–glycine (Leu–Gly), glutamate–glycine (Glu–Gly), or aspartic acid–glycine (Asp–Gly) (C) had no effect.

centrations tested, aspartic acid incorporation was only partially affected in the  $\Delta\text{ansP}$  mutant (approximately 60% of the wild-type values) and the apparent  $K_m$  of aspartic acid transport was similar in both strains (approximately 20  $\mu\text{M}$ ). These data strongly suggested the presence of additional aspartic acid transporter(s) in the  $\Delta\text{ansP}$  mutant.

We then measured  $^{14}\text{C}$ -Asp incorporation in wild-type *F. novicida* and in the  $\Delta\text{ansP}$  mutant, in the presence





**Fig. 6.** Transport assays.

A. Uptake of 10  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Asp by wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{ansP}$  mutant, over a 10 min period.

B. Kinetics of  $^{14}\text{C}$ -Asp uptake by wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{ansP}$  mutant at  $^{14}\text{C}$ -Asp concentrations ranging from 1 to 100  $\mu\text{M}$ . The apparent  $K_m$  of  $^{14}\text{C}$ -Asp transport for both strains (app. 20  $\mu\text{M}$ ) is indicated below the x-axis by an arrow.

C and D. (C)  $^{14}\text{C}$ -Asp uptake by wild-type *F. novicida* or (D)  $\Delta\text{ansP}$  mutant, in the presence of either 100  $\mu\text{M}$  of competing asparagine.

of increasing concentrations of competing asparagine (Fig. 6C and D). Fully supporting our first results, addition of asparagine reduced the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Asp, at all the concentrations tested in the wild-type strain. The uptake of  $^{14}\text{C}$ -Asp was not abrogated (40% to 60% reduction were recorded, with 100  $\mu\text{M}$  cold asparagine), most likely due to the presence of additional aspartic acid transporter(s) in the strain. Interestingly, addition of asparagine had no effect on the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Asp in the  $\Delta\text{ansP}$  mutant, strongly suggesting that the additional aspartic acid transporters do not mediate asparagine transport in the conditions tested. Altogether, these assays strongly suggest that AnsP is involved in the transport of both asparagine and aspartic acid; and that *Francisella* possesses additional aspartic acid transporter(s).

#### Contribution of AnsP to *Francisella* virulence

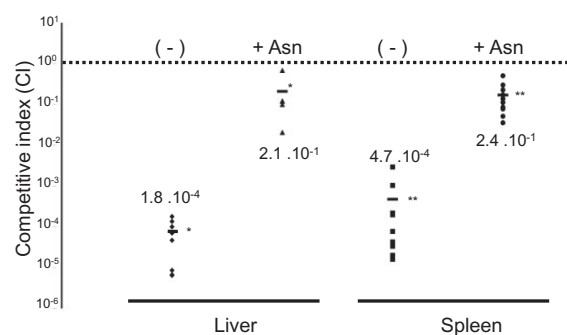
To determine if the AnsP protein played a role for the ability of *Francisella* to cause disease, we performed *in vivo* competition assays in 6- to 8-week-old BALB/c mice. Groups of five mice were inoculated by the intraperitoneal (i.p.) route with a 1:1 mixture of the wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{ansP}$  mutant strains. Multiplication in the liver and spleen was monitored at day 2 (Fig. 7). The competition index (CI), calculated in both target organs, was very low ( $2\text{--}5 \times 10^{-4}$ ), demonstrating that gene *ansP* is critical for virulence of *F. novicida* in the mouse model (Fig. 7).

Strikingly, upon treatment of the mice with asparagine (3 i.p. injections with 0.5 ml of a 0.5 mM solution of asparagine; see *Experimental procedures*), the CI in both organs raised approximately 1000-fold, in both liver and

spleen. This experiment demonstrated that asparagine supplementation *in vivo* also restored virulence of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant.

#### Discussion

In order to survive and multiply within their hosts, intracellular bacterial pathogens must evade host innate immune surveillance pathways (Jones *et al.*, 2012). They must also cope with a nutrient-restricted environment and have therefore evolved uptake systems adapted to the nutrient resources available in the host cell compartment



**Fig. 7.** *In vivo* dissemination. Groups of five female BALB/c mice were infected intraperitoneally (i.p.) with a 1:1 mixture of wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{ansP}$  mutant strain (100 cfu of each). + Asn. Mice were injected i.p. three times with 0.5 ml of a 0.5 mM solution of asparagine: 1 day before infection, and twice after infection (after 6 h and 12 h). (-) non-pretreated mice. The data represent the competitive index (CI) value (in ordinate) for cfu of mutant/wild-type in the liver (left part) and spleen (right part) of each mouse, 48 h after infection divided by cfu of mutant/wild-type in the inoculum. Bars represent the geometric mean CI value.

where they reside (Abu Kwaik and Bumann, 2013; Zhang and Rubin, 2013). We report here the identification of a novel amino acid transporter that is required for intracellular multiplication and virulence of the facultative intracellular pathogen *Francisella*. We show that inactivation of this transporter does not affect phagosomal escape but prevents bacterial multiplication in the host cytosol. Importantly, this work unravels for the first time the critical role of asparagine acquisition in the virulence of this pathogen.

The host cytosol, initially considered as a safe and nutrient-replete haven (Ray *et al.*, 2009), is now recognized as a potentially life-threatening and nutrient-deprived environment for invading bacteria. Intracellular bacterial pathogens have therefore learned to adapt their metabolism and are equipped with efficient uptake systems, to capture limiting nutrients (amino acids, carbohydrates, ions, . . .) from the host. Furthermore, intracellular bacteria have also developed a variety of strategies to modulate the nutritional content of the host cell compartment where they reside.

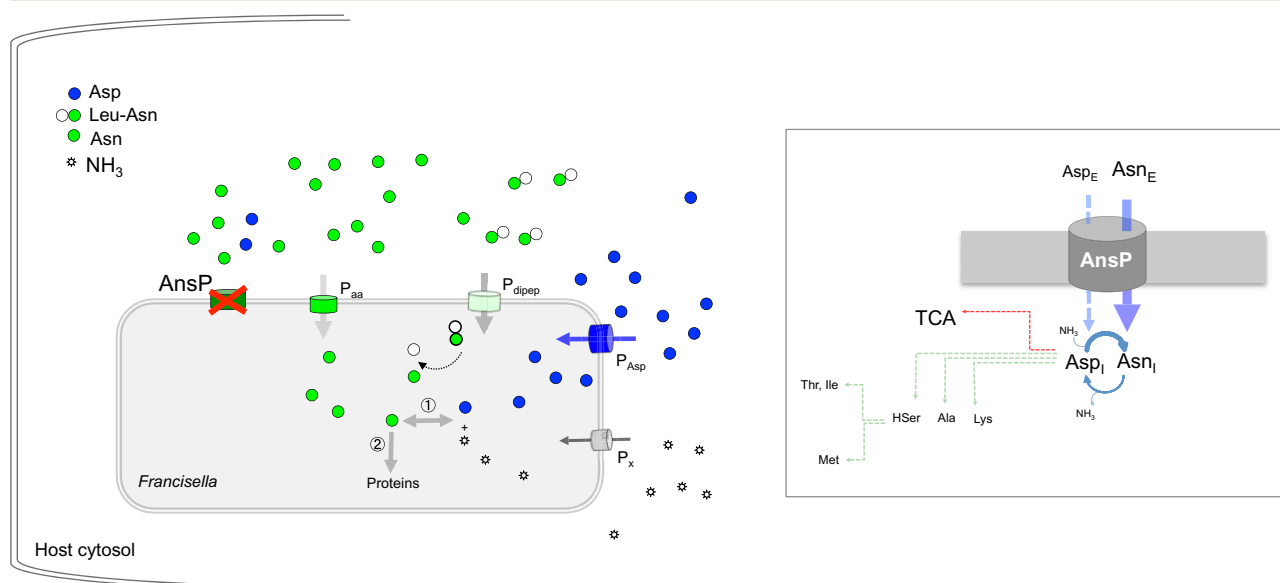
To fulfil their needs in amino acids, intracellular bacteria may take advantage of natural degradative pathways, such as proteasomal degradation and autophagy, like *Legionella* and *Anaplasma*, respectively (Price *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012), to access to plentiful sources of amino acids. Indeed, *L. pneumophila*, which resides in a vacuolar compartment that evades lysosomal fusion and is remodelled by the endoplasmic reticulum, injects the eukaryotic-like F box protein effector AnkB into the infected host cells (Al-Quadan *et al.*, 2012). After lipidation by the host farnesylation machinery, AnkB anchors to the vacuolar membrane and serves then as a platform for the assembly of Lys48-linked polyubiquitinated proteins. Their degradation by the host proteasome generates elevated levels of amino acids, which can be imported into the vacuole (Price *et al.*, 2011). The obligate intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*, which replicates inside a membrane-bound vacuole that resembles an early autophagosome but that does not fuse to lysosomes (Niu *et al.*, 2008), was recently shown to actively induce autophagy, by secreting the effector Ats-1. After translocation to the cytoplasm of infected cells, a portion of Ats-1 interacts with the host autophagosome initiation complex. Ats-1 autophagosomes are then recruited to the vacuole containing bacteria. Upon fusion of the two outer membranes, the autophagic content is released in the resulting vacuolar compartment (Niu *et al.*, 2012).

Of note, *F. tularensis* has been reported to induce the formation of a multi-membranous, autophagosome-like structure in primary murine macrophages, by Celli and co-workers (Checroun *et al.*, 2006), initially suggesting that the bacterium might use autophagosome as an alternative intracellular survival niche. However, more recent

studies have shown that only replication-deficient and chloramphenicol-treated *F. tularensis* were degraded via canonical autophagy (Chong *et al.*, 2012), implying that wild-type *F. tularensis* avoids classical autophagy. Of particular interest, Steel *et al.* very recently reported (Steele *et al.*, 2013) that *F. tularensis* induced autophagy in infected mouse embryonic fibroblasts and primary human monocytes. The authors showed that *F. tularensis* not only survived autophagy, but required autophagy for optimal intracellular growth. *F. tularensis* was shown to be able to import amino acids derived from host proteins. Furthermore, impaired intracellular growth upon autophagy inhibition could be rescued by supplying excess non-essential amino acids or pyruvate. Remarkably, *F. tularensis* intracellular replication was not affected in ATG5<sup>-/-</sup> macrophages or ATG5<sup>-/-</sup> MEF cells, indicating that the canonical autophagy pathway was not involved. Altogether, these data suggest that *F. tularensis* induces an ATG5-independent autophagy process in infected cells to obtain carbon and energy sources to support their intracellular replication.

Supporting the notion that *Legionella* and *Anaplasma* use these natural degradative pathways to acquire host nutrients for their growth, inhibition of these pathways (proteasomal degradation and autophagy respectively) block bacterial multiplication. Remarkably, in both cases, the resulting growth defects can be totally bypassed upon supplementation with excess amino acids (Price *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012).

Alternatively, intracellular bacteria may also stop growing to restrict their need as much as possible upon amino acid starvation (*Chlamydia*); or be self-sufficient and constitutively produce all their amino acids (*Mycobacterium tuberculosis*) (Zhang and Rubin, 2013). In the case of *Francisella*, we have previously shown that the bacterium used the cysteine-containing tripeptide glutathione (GSH) as a source of cysteine, to replicate in infected cells (Alkhuder *et al.*, 2009), thus suggesting that *Francisella* has evolved by exploiting the natural abundance of GSH in the host cytosol to compensate its natural auxotrophy for cysteine. We have also recently shown that *Francisella* infection simultaneously up-regulated the surface expression of the eukaryotic amino acid transporter SLC1A5 and the downregulation of SLC7A5, in infected monocytes (Barel *et al.*, 2012). Since both SLC7A5 and SLC1A5 work in concert to equilibrate the cytoplasmic amino acid pool (Fuchs and Bode, 2005), the differential effect of *Francisella* infection on their expression could be profitable to the bacterium for increasing the intracellular concentration of essential amino acids. These two examples suggest that *Francisella* is capable of triggering optimal intracellular nutrient growth conditions as well as taking advantage of abundant nutrients already present.



**Fig. 8.** Model of asparagine uptake by intracellular *Francisella*. Intracellular asparagine is transported by AnsP (dark green) in the absence of asparagine in the culture medium. In the absence of AnsP, the alternative amino acid permease  $P_{aa}$  (bright green) allows asparagine entry, when it is present at high concentration (in the mM range) in the culture medium.  $P_{dipep}$  (pale green). The dipeptide amino acid permease allows asparagine-containing dipeptides entry.  $P_{aa}$  (blue). The amino acid permease allowing aspartic acid entry.  $P$  (grey). The permease allowing ammonium entry. ① above the dotted grey arrow: Asparagine may either serve as a source of aspartic acid + ammonium (by the action of asparaginases) or be generated from aspartic acid + ammonium (by the action of asparagine synthases). ② above the dotted grey arrow: Asparagine is used as building block for protein synthesis. To the right. Upon entry into the bacterium via AnsP, asparagine can be metabolized into aspartic acid; which in turn can be transformed into a variety of important metabolites via different enzymatic pathways.

The capacity of the host cell to adapt its metabolism for starving the invading bacteria of essential nutrients has led to the now widely accepted paradigm of 'nutritional immunity' (Weinberg, 1975). In turn, the terms 'nutritional virulence' have been very recently proposed to designate the specific virulence properties of intracellular pathogens (Abu Kwaik, 2013; Abu Kwaik and Bumann, 2013). We found here that inactivation of the *ansP* gene (*FTN\_1586*) severely impaired *Francisella* intracellular multiplication in all cell types studied and successfully identified asparagine as the unique amino acid residue able to restore normal intracellular multiplication of the  $\Delta ansP$  mutant. Altogether, these data presented support the following model that is depicted in Fig. 8: AnsP is an asparagine transporter whose function is, not required in broth, but essential inside host cells. Remarkably, in infected cells, the absence of AnsP can be bypassed by alternative (probably less efficient) amino acid transporters ( $P_{aa}$ ) when the level of asparagine is high; and/or by peptide transporters ( $P_{dipep}$ ) (Meibom and Charbit, 2010a) supplying asparagine-containing peptides. The fact that asparagine supplementation of the  $\Delta ansP$  mutant, even after 1 h or 4 h of infection, completely alleviated the growth defect, establishes that asparagine is specifically required for bacterial multiplication in the cytosolic compartment of the host. We found that AnsP was also involved in aspartic acid transport. Remarkably, intracellular growth of the

$\Delta ansP$  mutant was only restored when both aspartic acid and ammonium were added, strongly suggesting that it is primarily the role of asparagine transporter that is critical for bacterial cytosolic multiplication.

Amino acids represent the major sources of carbon and energy for *Legionella* and *Francisella*. Both species have lost several of their amino acid biosynthetic pathways [arginine, serine, valine, threonine, methionine, cysteine, for *Legionella* (Ristroph *et al.*, 1981)]; arginine, histidine, lysine, tyrosine, methionine, cysteine, for *Francisella* (Larsson *et al.*, 2005). Hence, they both rely on the host to obtain these essential amino acids for their intracellular multiplication. However, mammalian cells are auxotrophic for several of these amino acids (Young, 1994). Their intracellular concentration is thus likely to be particularly critical for multiplication of these pathogens.

Asparagine is a non-essential amino acid for *Francisella* as well as for mammalian cells. Its physiological intracellular concentration is estimated in the  $\mu M$  range in mammalian cells (Rinehart and Canellakis, 1985; Wang *et al.*, 1998). The severe intracellular growth defect of the *ansP* mutant suggests that this concentration of asparagine is limiting for the multiplication of *Francisella* in infected cells, in the absence of the AnsP transporter. *In vivo*, the mammalian asparagine synthase (ASNS) enzyme catalyses the conversion of L-aspartic acid and

L-glutamine into L-asparagine and L-glutamate. However, although ubiquitously expressed, the levels of ASNS expression in adult animals may vary considerably among tissues (Balasubramanian *et al.*, 2013). Thus, *Francisella* must cope with variable pools of asparagine during *in vivo* dissemination.

Our data indicate that AnsP also transports aspartic acid, an amino acid at the crossroad of numerous important metabolic pathways, including the biogenesis of several amino acids (asparagine, methionine, threonine, isoleucine, alanine and lysine) and which can also serve as a precursor for pyrimidine biogenesis. The intracellular multiplication defect of the  $\Delta ansP$  mutant might thus be the consequence of the reduced capacity of the mutant to acquire both aspartic acid and asparagine.

Of note, *in silico* analysis of the predicted proteome of *F. novicida* revealed a broad heterogeneity in asparagine residues content per protein (ranging from 17.6% to less than 1% per coding sequence), with an average of 5.9% (i.e. close to 1/20). This rules out the possibility that asparagine acquisition might be needed due to an over-representation of this amino acid residue in *Francisella* proteins.

AnsP belongs to the Phagosomal transporter (Pht) subclass of MFS that is exclusively found among intracellular pathogenic bacteria. As recalled in the Introduction, *L. pneumophila* encodes the PhtA threonine transporter (Sauer *et al.*, 2005) that is required for intra-phagosomal bacterial growth and differentiation. Threonine is an essential amino acid for *Legionella* that is likely to be present in limiting concentration in the host (human cells are notably auxotroph for threonine). The growth defect of *phtA* mutant could be abrogated by supplementation with excess threonine or threonine-containing peptide, supporting the notion that the *Legionella*-containing phagosomes indeed do not contain sufficient peptides or threonine to bypass the *phtA* defect.

Our study confirms that, at least some, Pht members are involved in amino acid uptake but indicates that these transporters are not restricted to bacteria residing exclusively in a phagosomal compartment. This subfamily of MFS transporter might therefore be renamed ICAATs (for Intra Cellular Amino Acid Transporters). The present study unravels for the first time the role of an MFS transporter as a key player in *Francisella* intracellular nutrition, further strengthening the link between nutrition and virulence for intracellular pathogens. It is likely that a number of other *Francisella* MFS members are specifically involved in acquisition of other limiting intracellular substrates, still to be discovered. More generally, it is reasonable to assume that transporter family members contribute to the intracellular nutrition of many (if not all) intracellular bacteria and could thus constitute attractive

targets for the rational design of molecules to manage spread of these pathogens.

## Experimental procedures

### Bacterial strains and plasmids

*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* strain U112 (kindly provided by A. Sjöstedt) and its derivatives were grown: (i) in liquid, on Schaedler broth (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Tryptic Soya broth supplemented with cysteine (Becton, Dickinson and company) or Chamberlain chemically defined medium (Chamberlain, 1965), and (ii) in solid, on pre-made chocolate agar PolyViteX (BioMérieux SA Marcy l'Etoile, France) or chocolate plates prepared from GC medium base, IsoVitalex vitamins and haemoglobin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), at 37°C. *Escherichia coli* was grown in LB (Luria–Bertani, Difco) at 37°C. Ampicillin was used at a final concentration of 100 µg ml<sup>-1</sup> to select recombinant *E. coli* carrying pGEM and its derivatives. All bacterial strains, plasmids and primers used in this study are listed in Table S1.

Metabolic profiling was tested, using Biolog Phenotypic Microarray GNII plates. A positive respiration pattern (visualized by the appearance of a dark colour in the well) reflects the capacity of the bacterium to utilize the carbon sources tested. Each plate contained 96 different carbon sources, each present in non-limiting amounts. The assay was performed according to the Biolog guidelines (available at the internet site <http://www.biolog.com>).

### Bioinformatic analyses

Secondary structure predictions were performed using the program HMM<sup>TM</sup> available at the internet site <http://www.cbs.dtu.dk>.

### Construction of a chromosomal deletion mutants

$\Delta ansP$ . We generated a chromosomal deletion of gene *ansP* in wild-type *F. novicida* strain U112 ( $\Delta FTN_{1586}$ ), by allelic replacement of the wild-type region with a mutated region deleted of the entire gene (from the start codon to the TAA stop codon), substituted by the kanamycin (Kan) resistance gene *npt* placed under the control of the *pgro* promoter. First, the two regions (c. 600 bp each) flanking gene *ansP* (designated *FTN\_1586up* and *FTN\_1586down* respectively), and the *npt* gene [1161 bp, amplified from plasmid pFNLTP16H3 (Maier *et al.*, 2006)] were amplified by PCR using the following pairs of primers: (i) *FTN\_1586up*, p3/p4; *FTN\_1586down*, p5/p6, (ii) *npt*, p1/p2. The region *FTN\_1586up-npt* (c. 1700 bp) was then amplified by overlap PCR, using the *FTN\_1586-up* and *npt* products, and cloned into pGEM–T easy vector to yield plasmid pGEM *FTN\_1586-up/npt*. The fragment *FTN\_1586-down* was finally digested with PstI and Sall (New England Biolabs) and subcloned into the corresponding sites of plasmid pGEM–*FTN\_1586up-npt* (immediately downstream of the *npt* gene) to yield plasmid pGEM–*FTN\_1586up-npt-FTN\_1586down*. This plasmid was used as a template for the amplification of a 2260 bp fragment comprising *FTN\_1586up-npt-FTN\_1586down*, using primers p9/p10. This PCR product was gel purified (using the QIAquick Gel extraction



kit, QIAgen) and directly used to transform wild-type U112. Recombinant bacteria, resulting from allelic replacement of the wild-type region with the mutated *FTN\_1586up/npt/FTN\_1586down* region, were selected on Kan-containing plates ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). The mutant strain, designated  $\Delta\text{ansP}$  was checked for loss of the wild-type *ansP* gene, using specific primers, and by PCR sequencing (GATC Biotech).

**$\Delta\text{FTL}_{1645}$ .** We also generated a chromosomal deletion of the orthologous gene *FTL\_{1645}* in *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain LVS. For this, we used the counter selectable plasmid pMP812 (LoVullo *et al.*, 2009). The recombinant plasmid pMP812- $\Delta\text{FTL}_{1645}$  was constructed by overlap PCR. Primers p15/p16 amplified the 994 bp region upstream of position +1 of the *FTL\_{1645}* coding sequence, and primers p17/p18 amplified the 1012 bp region immediately downstream of the *FTL\_{1645}* stop codon (Table S1). Primers p16/p17 have an overlapping sequence of 23 nucleotides, resulting in complete deletion of the *FTL\_{1645}* coding sequence after cross-over PCR. PCR reactions with primers p15/p16 and p17/p18 were performed with exTaq polymerase (Fermentas). The products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAgen, CA). 200  $\mu\text{M}$  of each was used as a template for PCR with primers p15/p18 and treated with 30 cycles of PCR ( $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $54^\circ\text{C}$  for 30 s and  $72^\circ\text{C}$  for 120 s). The gel-purified 1996 bp fragment was digested with BamHI and NotI (New England Biolabs) and cloned into BamHI–NotI digested pMP812 (LoVullo *et al.*, 2009). The plasmid is introduced into *F. tularensis* LVS by electroporation. *F. tularensis* LVS was grown to  $\text{OD}_{600}$  0.3–0.6 in Schaedler-K3 broth; bacteria were collected and washed twice with 0.5 M sucrose. Bacteria were suspended in 0.6 ml of 0.5 M sucrose and 200  $\mu\text{l}$  was used immediately for electroporation in a 0.2 cm cuvette (2.5 kV, 25 mF, 600 W). After electroporation, bacteria were mixed with 1 ml of Schaedler-K3 broth and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 6 h before selection on chocolate agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kan. Colonies appeared after 3 days of incubation at  $37^\circ\text{C}$  and were subsequently passed once on plates with selection, followed by a passage in liquid medium without selection (to allow recombination to occur). Next, bacteria were passed once on agar plates containing 5% sucrose. Isolated colonies were checked for loss of the wild-type *FTL\_{1645}* gene by size analysis of the fragment obtained after PCR using primers combination p15/p18, p33/p18 and p15/p34. One colony harbouring a *FTL\_{1645}* deletion, as determined by PCR analysis, was used for further studies. Genomic DNA was isolated and used as the template in a PCR with primers p33/p34. The PCR product was directly sequenced using primers p33/p34 to verify the complete deletion of the *FTL\_{1645}* gene.

### Functional complementation

The plasmid used for complementation of the  $\Delta\text{ansP}$  mutant, pKK214-*pgro-ansP*, was constructed by overlap PCR. Primers p13/p14 amplified the wild-type *ansP* gene (1454 bp), and the primers p11/p12 amplified the 333 bp of the *pgro* promoter. Primers p12/p13 have an overlapping sequence of 20 nucleotides. PCR reactions with primer pairs p11/p12 and p13/p14, were performed with exTaq polymerase (Fermentas), and the products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAgen, CA). 200  $\mu\text{M}$  of each amplification product was used as a template for PCR with primers p11/p13 and treated with 30

cycles of PCR ( $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $54^\circ\text{C}$  for 30 s and  $72^\circ\text{C}$  for 120 s). The gel-purified 1787 bp fragment was digested with SmaI and PstI (New England Biolabs) and cloned into SmaI–PstI-digested pKK214. The plasmids pKK214 (empty plasmid) and pKK214-*pgro-ansP* (complementing plasmid) were introduced into U112 and the  $\Delta\text{ansP}$  mutant by electroporation.

### Growth kinetics in broth

Stationary-phase bacterial cultures of wild-type U112 and U112 $\Delta\text{ansP}$  mutant strains were diluted at a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.1 in tryptic soya broth (TSB). Every hour, the  $\text{OD}_{600}$  of the culture was measured, during a 9 h period.

### Transport assays

Cells were grown in Chamberlain medium to mid-exponential phase and then harvested by centrifugation and washed twice with Chamberlain without amino acid. The cells were suspended at a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.5 in the same medium containing  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  of chloramphenicol. After 15 min of pre-incubation at  $25^\circ\text{C}$ , uptake was started by the addition of L-[U- $^{14}\text{C}$ ] aspartic acid (Perkin Elmer), at various concentrations ( $^{14}\text{C}$ -Asp ranging from 1 to  $100 \mu\text{M}$ ); with or without competitor asparagine, at various concentrations (Asn ranging from  $10 \mu\text{M}$  to 1 mM). The radiolabelled  $^{14}\text{C}$ -Asp was at a specific activity of 7.4 GBq  $\text{mmol}^{-1}$ . Samples (100  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension) were removed at regular intervals and collected by vacuum filtration on membrane filters (Millipore type HA, 25 mm,  $0.22 \mu\text{m}$ ) and rapidly washed with Chamberlain without amino acid ( $2 \times 5 \text{ ml}$ ). At the end of each experiment, the filters were transferred to scintillation vials and counted in a Hidex 300 scintillation counter. The counts per minute (cpm) were converted to picomoles of amino acid taken up per sample, using a standard derived by counting a known quantity of the same isotope under similar conditions.

### Multiplication in macrophages

J774 (ATCC TIB67), BMM (ATCC TIB-202) and HepG-2 (ATCC HB 8065) cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum. Cells were seeded at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells per well in 12-well cells tissue plates, and monolayers were used at 24 h after seeding. J774, BMM and HepG2 macrophages monolayers were incubated for 60 min at  $37^\circ\text{C}$  with the bacterial suspensions (multiplicity of infection of 100) to allow the bacteria to enter. After washing (time zero of the kinetic analysis), the cells were incubated in fresh culture medium containing gentamicin ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to kill extracellular bacteria.

At several time points, cells were washed three times in DMEM, macrophages were lysed by addition of water and the titre of viable bacteria released from the cells was determined by spreading preparations on chocolate agar plates. For each strain and time in an experiment, the assay was performed in triplicate. Each experiment was independently repeated at least three times, and the data presented originate from one typical experiment. For  $\Delta\text{ansP}$  suppression experiments, amino acids or peptides were added to 3 mM at the time of infection and maintained throughout the infection.

### Electron microscopy

J774 cells were infected with wild-type *F. novicida* and mutant  $\Delta$ ansP bacteria. Samples for electron microscopy were prepared using the thin-sectioning procedure as previously described (Alkhuder *et al.*, 2009).

### Confocal experiments

J774 cells were infected with wild-type *F. novicida*,  $\Delta$ ansP or  $\Delta$ FPI strains for 1 h, 4 h and 10 h at 37°C, and were washed in KHM (110 mM potassium acetate, 20 mM Hepes, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Cells were incubated for 1 min with digitonin (50 µg ml<sup>-1</sup>) to permeabilize membranes. Then cells were incubated for 15 min at 37°C with primary anti-*F. novicida* mouse monoclonal antibody (1/500 final dilution). After washing, cells were incubated for 15 min at 37°C with secondary antibody (Ab) (Alexa Fluor 488-labelled GAM, 1/400 final dilution) in the dark. After washing, cells were fixed with PFA 4% for 15 min at room temperature (RT) and incubated for 10 min at RT with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl to quench residual aldehydes. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with primary anti-LAMP1 Ab (1/100 final dilution) in a mix with PBS, 0.1% saponine and 5% goat serum. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with secondary anti-rabbit Ab (Alexa 546-labelled, 1/400 dilution). DAPI was added (1/5000 final dilution) for 1 min. After washing, the glass coverslips were mounted in Mowiol. Cells were examined using an X63 oil-immersion objective on a LeicaTSP SP5 confocal microscope. Colocalization tests were performed by using Image J software; and mean numbers were calculated on more than 500 cells for each condition. Confocal microscopy analyses were performed at the Cell Imaging Facility (Faculté de Médecine Necker Enfants-Malades).

### Phagosome permeabilization assay

Quantification of phagosome permeabilization/vacuolar escape using the  $\beta$ -lactamase-CCF4 assay (Life technologies) was performed following manufacturer's instructions. Briefly, macrophages were infected as previously described for 1 h, washed and incubated in CCF4 for 1 h at room temperature in the presence of 2.5 mM probenid (Sigma). Cells were collected by gentle scraping and analysed by flow cytometry on a canto 2 cytometer (BD Bioscience) without any fixation step. Propidium iodide-negative cells were considered for the quantification of cells containing cytosolic *F. novicida* using excitation at 405 nm and detection at 450 nm (cleaved CCF4) or 535 nm (intact CCF4).

### Mice infections

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with guidelines established by the French and European regulations for the care and use of laboratory animals (Décrets 87-848, 2001-464, 2001-486 and 2001-131 and European Directive 2010/63/UE) and approved by the INSERM Ethics Committee (Authorization Number: 75-906).

Wild-type *F. novicida* and mutant strains were grown in TSB to exponential growth phase and diluted to the appropriate concentrations. Six- to 8-week-old female BALB/c mice (Janvier, Le

Genest St Isle, France) were intraperitoneally (i.p.) inoculated with 200 µl of bacterial suspension. The actual number of viable bacteria in the inoculum was determined by plating dilutions of the bacterial suspension on chocolate plates. For competitive infections, wild-type *F. novicida* and mutant bacteria were mixed in 1:1 ratio and a total of 100 bacteria were used for infection of each of five mice. After 2 days, mice were sacrificed. Homogenized spleen and liver tissue from the five mice in one experiment were mixed, diluted and spread on to chocolate agar plates. Kanamycin selection to distinguish wild-type and mutant bacteria were performed. For  $\Delta$ ansP supplementation experiments, asparagine was injected i.p. into mice (500 µl of a 0.5 mM solution) 14 h before infection and during infection, at days 1 and 2.

### Acknowledgements

We thank Dr A. Sjöstedt for providing the strain LVS. These studies were supported by INSERM, CNRS and Université Paris Descartes Paris Cité Sorbonne. Gael Gesbert was funded by a fellowship from the 'Délégation Générale à l'Armement' (DGA) and Elodie Ramond by a fellowship from the 'Région Ile de France'.

### References

- Abu Kwaik, Y. (2013) Targeting nutrient retrieval by *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 1–2.
- Abu Kwaik, Y., and Bumann, D. (2013) Microbial quest for food *in vivo*: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cell Microbiol* **15**: 882–890.
- Al-Quadan, T., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. (2012) Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol* **20**: 299–306.
- Alkhuder, K., Meibom, K.L., Dubail, I., Dupuis, M., and Charbit, A. (2009) Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* **5**: e1000284.
- Asare, R., and Abu Kwaik, Y. (2010) Molecular complexity orchestrates modulation of phagosome biogenesis and escape to the cytosol of macrophages by *Francisella tularensis*. *Environ Microbiol* **12**: 2559–2586.
- Asare, R., Akimana, C., Jones, S., and Abu Kwaik, Y. (2010) Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors. *Environ Microbiol* **12**: 2587–2612.
- Balasubramanian, M.N., Butterworth, E.A., and Kilberg, M.S. (2013) Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**: E789–E799.
- Barel, M., Meibom, K., and Charbit, A. (2010) Nucleolin, a shuttle protein promoting infection of human monocytes by *Francisella tularensis*. *PLoS ONE* **5**: e14193.
- Barel, M., Meibom, K., Dubail, I., Botella, J., and Charbit, A. (2012) *Francisella tularensis* regulates the expression of the amino acid transporter SLC1A5 in infected THP-1 human monocytes. *Cell Microbiol* **14**: 1769–1783.
- Broms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., and Sjöstedt, A. (2012) Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS ONE* **7**: e50473.
- Brotcke, A., Weiss, D.S., Kim, C.C., Chain, P., Malfatti, S., Garcia, E., and Monack, D.M. (2006) Identification

- of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* **74**: 6642–6655.
- Celli, J., and Zahrt, T.C. (2013) Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a010314.
- Chamberlain, R.E. (1965) Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl Microbiol* **13**: 232–235.
- Checroun, C., Wehrly, T.D., Fischer, E.R., Hayes, S.F., and Celli, J. (2006) Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14578–14583.
- Chen, D.E., Podell, S., Sauer, J.D., Swanson, M.S., and Sailer, M.H., Jr (2008) The phagosomal nutrient transporter (Pht) family. *Microbiology* **154**: 42–53.
- Chong, A., and Celli, J. (2010) The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front Microbiol* **1**: 1–12.
- Chong, A., Wehrly, T.D., Child, R., Hansen, B., Hwang, S., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012) Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy* **8**: 1342–1356.
- Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005) Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* **15**: 254–266.
- Fuller, J.R., Craven, R.R., Hall, J.D., Kijek, T.M., Taft-Benz, S., and Kawula, T.H. (2008) RipA, a cytoplasmic membrane protein conserved among *Francisella* species, is required for intracellular survival. *Infect Immun* **76**: 4934–4943.
- Hall, J.D., Woolard, M.D., Gunn, B.M., Craven, R.R., Taft-Benz, S., Frelinger, J.A., and Kawula, T.H. (2008) Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect Immun* **76**: 5843–5852.
- Jones, C.L., Napier, B.A., Sampson, T.R., Llewellyn, A.C., Schroeder, M.R., and Weiss, D.S. (2012) Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 383–404.
- Juruj, C., Lelogeais, V., Pierini, R., Perret, M., Py, B.F., Jamilloux, Y., et al. (2013) Caspase-1 activity affects AIM2 speck formation/stability through a negative feedback loop. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 1–11.
- Keim, P., Johansson, A., and Wagner, D.M. (2007) Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* **1105**: 30–66.
- Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., et al. (2005) The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* **37**: 153–159.
- Lauriano, C.M., Barker, J.R., Nano, F.E., Arulanandam, B.P., and Klose, K.E. (2003) Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 195–202.
- Llewellyn, A.C., Jones, C.L., Napier, B.A., Bina, J.E., and Weiss, D.S. (2011) Macrophage replication screen identifies a novel *Francisella* hydroperoxide resistance protein involved in virulence. *PLoS ONE* **6**: e24201.
- LoVullo, E.D., Molins-Schneekloth, C.R., Schweizer, H.P., and Pavelka, M.S., Jr (2009) Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis*. *Microbiology* **155**: 1152–1163.
- Maier, T.M., Pechous, R., Casey, M., Zahrt, T.C., and Frank, D.W. (2006) *In vivo* Himar1-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1878–1885.
- Marohn, M.E., Santiago, A.E., Shirey, K.A., Lipsky, M., Vogel, S.N., and Barry, E.M. (2012) Members of the *Francisella tularensis* phagosomal transporter subfamily of major facilitator superfamily transporters are critical for pathogenesis. *Infect Immun* **80**: 2390–2401.
- Meibom, K.L., and Charbit, A. (2010a) *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol* **1**: 1–13.
- Meibom, K.L., and Charbit, A. (2010b) The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. *Curr Opin Microbiol* **13**: 11–17.
- Mortensen, B.L., Fuller, J.R., Taft-Benz, S., Collins, E.J., and Kawula, T.H. (2012) *Francisella tularensis* RipA protein topology and identification of functional domains. *J Bacteriol* **194**: 1474–1484.
- Napier, B.A., Meyer, L., Bina, J.E., Miller, M.A., Sjöstedt, A., and Weiss, D.S. (2012) Link between intraphagosomal biotin and rapid phagosomal escape in *Francisella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 18084–18089.
- Niu, H., Yamaguchi, M., and Rikihisa, Y. (2008) Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* **10**: 593–605.
- Niu, H., Xiong, Q., Yamamoto, A., Hayashi-Nishino, M., and Rikihisa, Y. (2012) Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 20800–20807.
- Nothelfer, K., Dias Rodrigues, C., Bobard, A., Phalipon, A., and Enninga, J. (2011) Monitoring *Shigella flexneri* vacuolar escape by flow cytometry. *Virulence* **2**: 54–57.
- Oyston, P.C., Sjöstedt, A., and Titball, R.W. (2004) Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 967–978.
- Pechous, R., Celli, J., Penoske, R., Hayes, S.F., Frank, D.W., and Zahrt, T.C. (2006) Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* **74**: 4452–4461.
- Pechous, R.D., McCarthy, T.R., Mohapatra, N.P., Soni, S., Penoske, R.M., Salzman, N.H., et al. (2008) A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge. *PLoS ONE* **3**: e2487.
- Pechous, R.D., McCarthy, T.R., and Zahrt, T.C. (2009) Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 684–711.
- Peng, K., and Monack, D.M. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* **78**: 2723–2733.
- Price, C.T., Al-Quadan, T., Santic, M., Rosenshine, I., and Abu Kwaik, Y. (2011) Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* **334**: 1553–1557.



- Qin, A., and Mann, B.J. (2006) Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol* **6**: 69.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P.J., and Tang, C.M. (2009) Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 333–340.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., and Saier, M.H., Jr (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J* **279**: 2022–2035.
- Rinehart, C.A., Jr, and Canellakis, E.S. (1985) Induction of ornithine decarboxylase activity by insulin and growth factors is mediated by amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4365–4368.
- Ristroph, J.D., Hedlund, K.W., and Gowda, S. (1981) Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* **13**: 115–119.
- Santic, M., Asare, R., Skrobonja, I., Jones, S., and Abu Kwaik, Y. (2008) Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun* **76**: 2671–2677.
- Sauer, J.D., Bachman, M.A., and Swanson, M.S. (2005) The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9924–9929.
- Schulert, G.S., McCaffrey, R.L., Buchan, B.W., Lindemann, S.R., Hollenback, C., Jones, B.D., and Allen, L. (2009) *Francisella tularensis* genes required for inhibition of the neutrophil respiratory burst and intramacrophage growth identified by random transposon mutagenesis of strain LVS. *Infect Immun* **77**: 1324–1336.
- Sjöstedt, A. (2007) Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* **1105**: 1–29.
- Sjöstedt, A. (2011) Special topic on *Francisella tularensis* and tularemia. *Front Microbiol* **2**: 86. doi:10.3389/fmicb.2011.00086.
- Steele, S., Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., and Kawula, T. (2013) *Francisella tularensis* harvests nutrients derived via ATG5-independent autophagy to support intracellular growth. *PLoS Pathog* **9**: e1003562.
- Wang, J.Y., Li, J., Patel, A.R., Summers, S., Li, L., and Bass, B.L. (1998) Synergistic induction of ornithine decarboxylase by asparagine and gut peptides in intestinal crypt cells. *Am J Physiol* **274**: C1476–C1484.
- Wehrly, T.D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Child, R., Edwards, J.A., et al. (2009) Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiol* **11**: 1128–1150.
- Weinberg, E.D. (1975) Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA* **231**: 39–41.
- Weiss, D.S., Brotcke, A., Henry, T., Margolis, J.J., Chan, K., and Monack, D.M. (2007) *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 6037–6042.
- Young, V.R. (1994) Adult amino acid requirements: the case for a major revision in current recommendations. *J Nutr* **124**: 1517S–1523S.
- Zhang, Y.J., and Rubin, E.J. (2013) Feast or famine: the host–pathogen battle over amino acids. *Cell Microbiol* **15**: 1079–1087.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Supplemental Experimental procedures

**Fig. S1.** The gene *ansP* of *F. novicida*.

A. Schematic organization of the *ansP* region. The *ansP* gene of *F. novicida* is flanked by two genes in the same orientation (*FTN\_1587*, upstream; and *FTN\_1585*, downstream), separated by intergenic regions (69 bp and 56 bp respectively).

B. RACE PCR. The transcription start of *ansP*, determined by RACE PCR, is shown. The putative  $\sigma^{70}$ -dependent –10 and –35 sequences are in red. The translation start codon of *ansP* and the preceding putative Shine–Dalgarno sequence (SD) are in italics and underlined.

C. Quantitative real-time RT-PCR. Quantification of *FTN\_1585* and *FTN\_1587* expression in wild-type *F. novicida* (WT) or  $\Delta ansP$  mutant were performed in TSB at 37°C. qRT-PCRs were performed twice using independent samples (in triplicate).

**Fig. S2.** The AnsP protein is highly conserved among *Francisella* subspecies. Left panel. Multiple amino acid sequence alignments (CLUSTAL 2.1) of *FTN\_1586* (AnsP) with its orthologues in *F. tularensis* subsp. *holarctica* (FTL\_1645), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (FTM\_0191) and *F. tularensis* subsp. *tularensis* (FTT\_0129). In the KEGG database, two of the four proteins have slightly different sizes due to different predicted start codons. Right panel. In LVS, the predicted protein FTL\_1645 is 403 aa in length (i.e. 30 aa shorter than in *F. novicida* FTM\_1586). In Schu S4, the predicted protein FTT\_0121 is 422 aa in length (i.e. 15 aa shorter than *F. novicida* FTM\_1586). However, a careful inspection of the proximal and upstream portions of the four gene sequences, revealed the presence of a single base difference at codon 16 (*F. novicida* nomenclature) leading to a TCG to TTG codon modification (changing serine16 in FTM\_1586 to leucine, in the proteins from three other subspecies). The four proteins are thus likely to encode a 437 aa protein, except FTL\_1645 that is four amino acid shorter at its C-terminus.

**Fig. S3.** Growth in CDM.

A. Setting up of a modified chemically defined medium (CDM<sub>min</sub>). We re-evaluated systematically the actual amino acid requirement of *F. novicida* U112 in chemically defined medium (CDM) (Chamberlain, 1965). Bacterial growth was assayed in CDM devoid of each individual amino acid (left column, CDM amino acid). This led us to redefine three classes of amino acids (right column, amino acid types). Essential amino acids (E-AAs): means, if absent, no growth. Useful non-essential (UNE-AAs): means, if absent growth impaired but not abolished. Non-essential (NE-AAs): means U112 is prototroph for all these amino acids (threonine, valine, asparagine, alanine, glutamic acid, glutamine, glycine, phenylalanine, tryptophane). Confirming earlier reports, the E-AAs were: arginine, histidine, lysine, methionine, tyrosine, cysteine. CDM<sub>min</sub> contains all the amino acids required for optimal growth of U112. It corresponds to classical Chamberlain medium (CDM) without threonine and valine.



B. Growth of WT and  $\Delta ansP$  strains in CDM<sub>min</sub> at 37°C.

**Fig. S4.** Biolog GN II plate assay. The list of substrates that *Francisella* actually metabolizes is shown to the right of the figure. ++, dark blue staining; +, pale blue staining.

**Fig. S5.** Intracellular multiplication defect of the mutant  $\Delta ansP$  in LVS is fully rescued by addition of asparagine. The intracellular multiplication of the  $\Delta FTL\_1645$  mutant was impaired in J774

macrophages as compared to wild-type LVS (> 10-fold reduction of bacterial counts after 48 h). When DMEM was supplemented with 3 mM asparagine (+ asn), intracellular growth of the  $\Delta FTL\_1645$  mutant was identical to that of wild-type LVS (+/- asn).

**Table S1.** Strains, plasmids and primers used in this study.

## 1    **Supporting information**

2    **Gesbert et al.**

3

## 4    **Supplemental Experimental procedures**

### 5    **Isolation of total RNA and reverse transcription**

6    Bacteria were centrifuged for 2 min in a microcentrifuge at room temperature and the  
7    pellet was quickly re-suspended in Trizol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).  
8    Samples were either processed immediately or frozen and stored at -80°C. Samples  
9    were treated with chloroform and the aqueous phase was used in the RNeasy Clean-  
10    up protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA) with an on-column DNase digestion of 30  
11    min [Thompson, 2003 #358].

12    RNA Reverse transcription (RT)-PCR experiments were carried out with 500 ng of  
13    RNA and 2 pmol of specific reverse primers, for each amplification reaction. After  
14    denaturation at 65°C for 5 min, 6 µL of the mixture containing 4 µL of 5X first strand  
15    buffer, 2 µL of 0,1M DTT and 1 µL of Superscript II RT (Thermo Scientific).  
16    Samples were incubated for 50 min at 42°C, heated at 70°C for 15 min and chilled on  
17    ice. Samples were diluted with 180 µL of H<sub>2</sub>O and stored at -20°C. PCR conditions  
18    were identical for all reactions.

19    The following pair of primers was used to amplify the mRNA corresponding to the  
20    transcript of *FTL\_1585* and *FTN\_1587*: p27/p29 and p26/ p28, respectively.  
21    Similarly, to amplify the mRNA corresponding to the transcript of two (or more)  
22    consecutive genes, one primer was chosen in the distal part of the first gene and the  
23    other in the proximal part of the last gene (for *FTN\_1585/FTN\_1586*: primers p24/  
24    p30; for *FTN\_1586/FTN\_1587*: primers p29/ p31; see **Table S1**).

25

### 26    **Quantitative real-time RT-PCR**

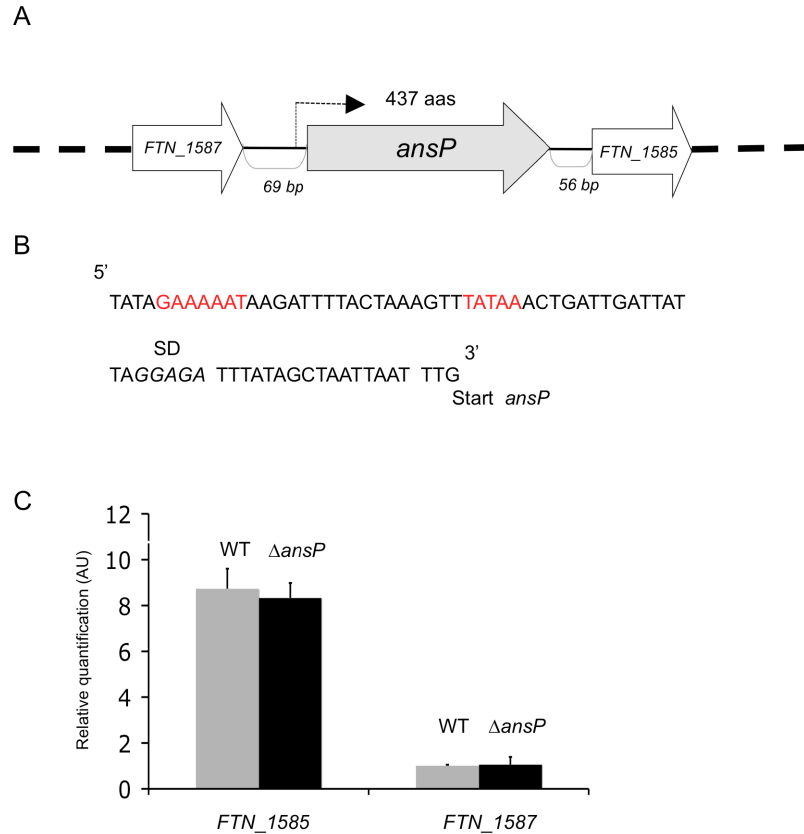
27    *F. novicida* U112 and mutant strains were grown at 37°C from OD<sub>600</sub> ~ 0.1. After 4h  
28    of incubation, samples were harvested and RNA was isolated. 500 ng of RNA was  
29    reverse transcribed: the 25 µL reaction consisted of 5 µL of cDNA template, 12,5 µL  
30    of Fastart SYBR Green Master (Roche Diagnostics), 2 µL of 10 µmol of each primer  
31    and 3,5 µL of water. qRT-PCR was performed according manufacturer's protocol on  
32    Applied Biosystems - 7900HT Fast-Real-Time PCR System (Invitrogen, Carlsbad,  
33    CA, USA). To calculate the amount of gene-specific transcript, a standard curve was  
34    plotted for each primer set using a series of diluted genomic DNA from U112. The  
35    amounts of *FTN\_1585*, *FTN\_1586*, and *FTN\_1587* transcripts were normalized to the  
36    DNA helicase gene (*FTN\_1594*) transcript, whose expression is only slightly changed  
37    during growth [Brotcke, 2006 #463].

38

### 39    **Determination of transcription start site**

40    The 5' end of the *ansP* mRNA was determined by employing the method of rapid  
41    amplification of cDNA ends (5'-RACE) using the 5/3-RACE kit from Invitrogen. One  
42    microgram of RNA isolated from U112 grown in Schaedler-K3 medium in  
43    exponential phase was used as the template for cDNA synthesis with the gene-specific  
44    primer p19 (**Table S1**). The cDNA was purified using the QIAquick PCR purification  
45    kit (Qiagen, Valencia, CA), poly(C) tailed at the 3' end, and amplified by PCR using  
46    the gene-specific primer p19 and the poly(A) tail-specific primer oligo(dG) anchor.  
47    An aliquot of the PCR product was used as the template in a second PCR with primer

p20 and PCR anchor primers. The PCR product obtained was directly sequenced and gave position -24 as the 5' end relative to the translational start.



# **Figure S1. The gene *ansP* of *F. novicida***

**(A) Schematic organization of the *ansP* region.** The *ansP* gene of *F. novicida* is flanked by two genes in the same orientation (*FTN\_1587*, upstream; and *FTN\_1585*, downstream), separated by intergenic regions (69 bp and 56 b, respectively).

**(B) RACE PCR.** The transcription start of *ansP*, determined by RACE PCR, is shown. The putative  $\sigma^{70}$ -dependent -10 and -35 sequences are in red. The translation start codon of *ansP* and the preceding putative Shine-Dalgarno sequence (SD) are in italics and underlined.

**(C) Quantitative real-time RT-PCR.** Quantification of *FTN\_1585* and *FTN\_1587* expression in wild-type *F. novicida* (WT) or  $\Delta ansP$  mutant were performed in TSB at 37°C. qRT-PCRs were performed twice using independent samples (in triplicate).

```

ftu_FTT_0129 -----MSILRLYLKYIFSYTMQKVTKAGFIWIFCAFFYALEFIIRASGN
ftl_FTL_1645 -----MQKVTKAGFIWIFCAFFYALEFIIRASGN
ftn_FTN_1586 MLVSKKLFVFTYSGFSSILRLYLKYIFSYTMQKVTKAGFIWIFCAFFYALEFIIRASGN
ftm_FTM_0191 MLVSKKLFVFTYSGFSSILRLYLKYIFSYTMQKVTKAGFIWIFCAFFYALEFIIRASGN
*****

ftu_FTT_0129 SLYNDFSIAPYNLSPEQISVLSSAFYWAYVASQLPAGILIDKFGVKKIMLVSTLLFSVGV
ftl_FTL_1645 SLYNDFSIAPYNLSPEQISVLSSAFYWAYVASQLPAGILIDKFGVKKIMLVSTLLFSVGV
ftn_FTN_1586 SLYNDFSIAPYNLSPEQISVLSSAFYWAYVASQLPAGILIDKFGVKKIMLVSTLLFSVGV
ftm_FTM_0191 SLYNDFSIAPYNLSPEQISVLSSAFYWAYVASQLPAGILIDKFGVKKIMLVSTLLFSVGV
*****

ftu_FTT_0129 FIATRATSQEYLILYRVLAGVGGGFAPLSALKSIAIWLKRTFFLFTGATQMLMYGAGTL
ftl_FTL_1645 FIATRATSQEYLILYRVLAGVGGGFAPLSALKSIAIWLKRTFFLFTGATQMLMYGAGTL
ftn_FTN_1586 FIATRATSQEYLILYRVLAGVGGGFAPLSALKSIAIWLKRTFFLFTGATQMLMYGAGTL
ftm_FTM_0191 FIATRATSQEYLILYRVLAGVGGGFAPLSALKSIAIWLKRTFFLFTGATQMLMYGAGTL
*****

ftu_FTT_0129 TGLPLVILANHFSIQVIMSVILVVSILLFLSVVFFIPTVEPHNQKDTDELADHTKIEDI
ftl_FTL_1645 TGLPLVILANHFSIQVIMSVILVVSILLFLSVVFFIPTVEPHNQKDTDELADHTKIEDI
ftn_FTN_1586 TGLPLVILANHFSIQVIMSVILVVSILLFLSVVFFIPTVEPHNQKDTDELADHTKIEDI
ftm_FTM_0191 TGLPLVILANHFSIQVIMSVILVVSILLFLSVVFFIPTVEPHNQKDTDELADHTKIEDI
*****

ftu_FTT_0129 FIVFKIKQILLNGFFCPTIYGTATFADLMSYRFLSLDGYSVHYAGLASSMIFIGIAIFS
ftl_FTL_1645 FIVFKIKQILLNGFFCPTIYGTATFADLMSYRFLSLDGYSVHYAGLASSMIFIGIAIFS
ftn_FTN_1586 FIVFKIKQILLNGFFCPTIYGTATFADLMSYRFLSLDGYSVHYAGLASSMIFIGIAIFS
ftm_FTM_0191 FIVFKIKQILLNGFFCPTIYGTATFADLMSYRFLSLDGYSVHYAGLASSMIFIGIAIFS
*****

ftu_FTT_0129 PLWGVIAITLNNKQKSLVLASIFGLFIVIAIVYMHVDPIIMCILCILWGGMQAVHVLNFT
ftl_FTL_1645 PLWGVIAITLNNKQKSLVLASIFGLFIVIAIVYMHVDPIIMCILCILWGGMQAVHVLNFT
ftn_FTN_1586 PLWGVIAITLNNKQKSLVLASIFGLFIVIAIVYMHVDPIIMCILCILWGGMQAVHVLNFT
ftm_FTM_0191 PLWGVIAITLNNKQKSLVLASIFGLFIVIAIVYMHVDPIIMCILCILWGGMQAVHVLNFT
*****

ftu_FTT_0129 ILRMHISPLYIATGIAAVNLFIPLSGAVLQFFVGFVVSILENHGFEQLIAFKYALAILPV
ftl_FTL_1645 ILRMHISPLYIATGIAAVNLFIPLSGAVLQFFVGFVVSILENHGFEQLIAFKYALAILPV
ftn_FTN_1586 ILRMHISPLYIATGIAAVNLFIPLSGAVLQFFVGFVVSILENHGFEQLIAFKYALAILPV
ftm_FTM_0191 ILRMHISPLYIATGIAAVNLFIPLSGAVLQFFVGFVVSILENHGFEQLIAFKYALAILPV
*****

ftu_FTT_0129 LMLLSIVLSLFI-----
ftl_FTL_1645 LMLLSIVLSLFI-----
ftn_FTN_1586 LMLLSIVLSLFI-----
ftm_FTM_0191 LMLLSIVLSLFI-----
*****

```

FTN (93 first bases of the predicted CDS)  
TTG TTA GTA TCT AAA AAA TTA TTT GTA TTT ACA  
TAT TCT GGC TTT TCG AGC ATA ATC TTG AGA TAT  
CTA AAA TAC ATT TTC AGT TAT ACT ATG...

FTL (90 bases upstream and ATG start codon ie 30 aas)  
TTG TTA GTA TCT AAA AAA TTA TTT GTA TTT ACA  
TAT TCT GGC TTT TCG AGC ATA ATC TTG AGA TAT  
CTA AAA TAC ATT TTC AGT TAT ACT ATG...

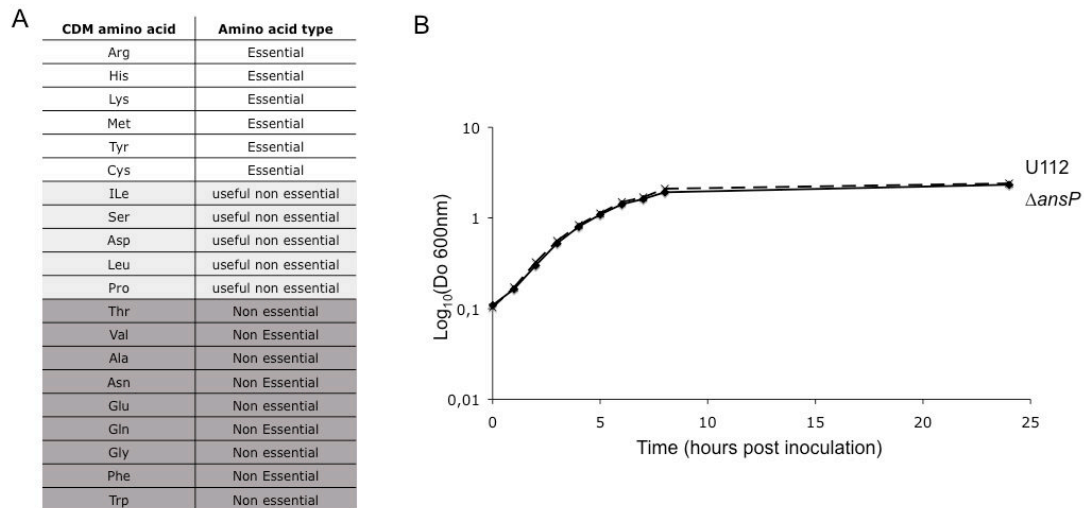
FTT (45 bases upstream of ie 15 aas and TTG start codon)  
TTG TTA GTA TCT AAA AAA TTA TTT GTA TTT ACA  
TAT TCT GGC TTT TCG...

TCG -> TTG  
S -> L

**Fig. S2. The AnsP protein is highly conserved among *Francisella* subspecies**

**Left panel.** Multiple amino acid sequence alignments (CLUSTAL 2.1) of FTL\_1586 (AnsP) with its orthologues in *F. tularensis* subsp *holarctica* (FTL\_1645), *F. tularensis* subsp *mediasiatica* (FTM\_0191), and *F. tularensis* subsp *tularensis* (FTT\_0129). In the KEGG database, two of the four proteins have slightly different sizes due to different predicted start codons.

**Right panel.** In LVS, the predicted protein FTL\_1645 is 403 aa in length (ie. 30 aa shorter than in *F. novicida* FTL\_1586). In Schu S4, the predicted protein FTT\_0121 is 422 aa in length (ie. 15 aa shorter than *F. novicida* FTL\_1586). However, a careful inspection of the proximal and upstream portions of the four gene sequences, revealed the presence of a single base difference at codon 16 (*F. novicida* nomenclature) leading to a TCG to TTG codon modification (changing serine16 in FTL\_1586 to leucine, in the proteins from three other subspecies). The four proteins are thus likely to encode a 437 aa protein, except FTL\_1645 that is four amino acid shorter at its C-terminus.



### Figure S3. Growth in CDM

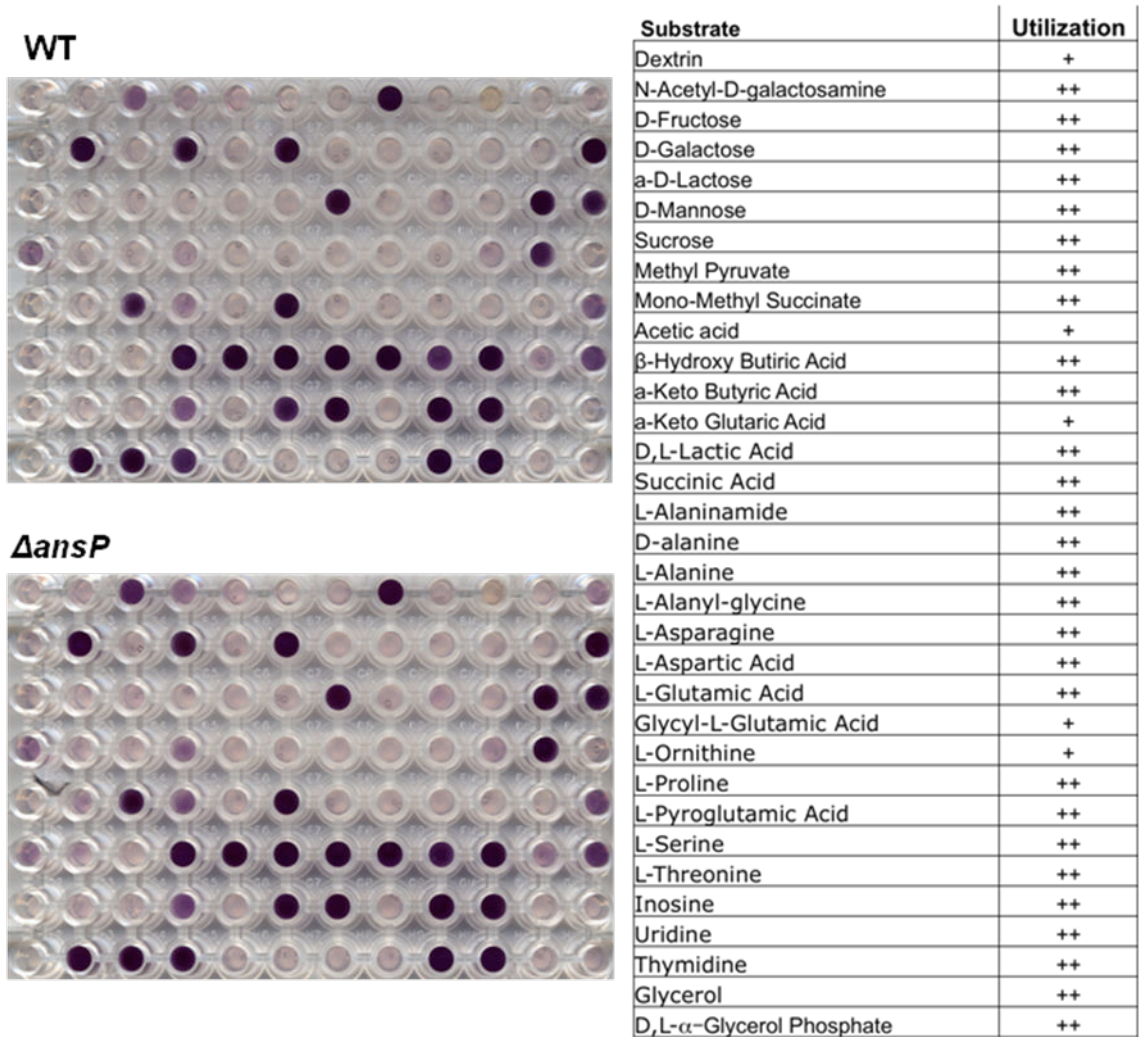
#### (A) Setting up of a modified chemically defined medium (CDM<sub>min</sub>)

We re-evaluated systematically the actual amino acid requirement of *F. novicida* U112 in chemically-defined medium (CDM) [29]. Bacterial growth was assayed in CDM devoid of each individual amino acid (left column, CDM amino acid). This led us to redefine three classes of amino acids (right column, amino acid types). Essential amino acids (E-AAs): means, if absent, no growth. Useful non-essential (UNE-AAs): means, if absent growth impaired but not abolished. Non-essential (NE-AAs): means U112 is prototroph for all these amino acids (threonine, valine, asparagine, alanine, glutamic acid, glutamine, glycine, phenylalanine, tryptophane). Confirming earlier reports, the E-AAs were: arginine, histidine, lysine, methionine, tyrosine, cysteine.

CDM<sub>min</sub> contains all the amino acids required for optimal growth of U112. It corresponds to classical Chamberlain medium (CDM) without threonine and valine.

#### (B) Growth of WT and $\Delta ansP$ strains in CDM<sub>min</sub> at 37°C

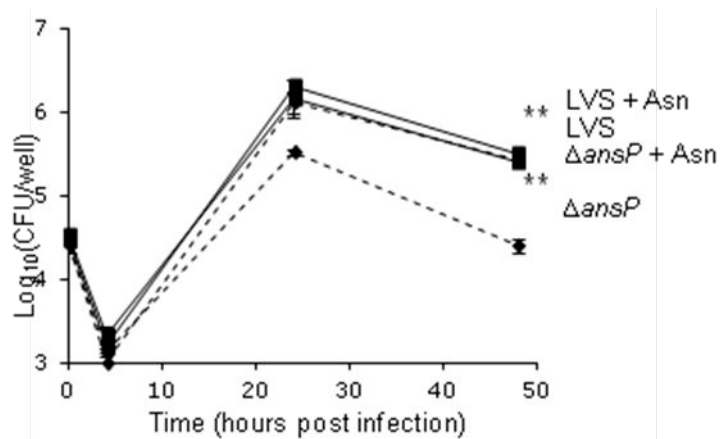
105



106  
107

108 **Figure S4. Biolog GN II plate assay.** The list of substrates that Francisella  
109 actually metabolizes is shown to the right of the Figure. ++, dark blue staining, + pale  
110 blue staining.  
111

112



**Figure S5. Intracellular multiplication defect of the mutant  $\Delta ansP$  in LVS is fully rescued by addition of asparagine.**

The intracellular multiplication of the  $\Delta FTL_{1645}$  mutant was impaired in J774 macrophages as compared to wild-type LVS (>10-fold reduction of bacterial counts after 48 h). When DMEM was supplemented with 3 mM asparagine (+ asn), intracellular growth of the  $\Delta FTL_{1645}$  mutant was identical to that of wild-type LVS (+/- asn).

125

126

127 **Table S1 : Strains, plasmids and primers used in this study**

128

Strains, plasmids, primers	Description or sequence (5' _ 3')	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> K12	<i>TOP 10</i>	Invitrogen
U112	<i>F. tularensis</i> ssp <i>novicida</i> U112	T. Henry
U112 $\Delta$ FPI	Chromosomal deletion of the entire <i>Francisella</i> pathogenicity island (FPI)	Weiss <i>et al.</i> (2007)
U112 $\Delta$ ansP	Chromosomal deletion of <i>FTN_1586</i> substituted by a <i>npt</i> -encoded kanamycine resistance cassette.	This work
U112 $\Delta$ ansP (pFNLTP6 pgro-ansP)	U112 $\Delta$ ansP containing complementing plasmid pFNLTP6 pgro- <i>FTN_1586</i>	This work
LVS	<i>F. tularensis</i> ssp <i>holarctica</i> strain LVS	A. Sjostedt
LVS $\Delta$ FTL_1654	Chromosomal deletion of <i>FTL_1645</i>	This work
LVS $\Delta$ FTL_1645 (pFNLTP6pgro-FTL_1645)	LVS $\Delta$ FTN_1645 containing complementing plasmid pFNLTP6 pgro- <i>FTL_1645</i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pGEM	<i>E. coli</i> cloning vector; Amp <sup>R</sup>	Promega
pGEM- <i>FTN_1586</i> up/kan/down	pGEM containing the indel; Kan <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup>	This work
pGEM- <i>FTL_1645</i> up /down	pGEM containing the indel; Amp <sup>R</sup>	This work
pFNLTP6 pgro	<i>E. coli</i> / <i>F. tularensis</i> shuttle vector; Kan <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> Expression of the kanamycine resistance <i>npt</i> gene under pgro promoter control	Maier <i>et al.</i> (2006)
pFNLTP6 pgro- <i>FTN_1586</i>	pFNLTP6 pgro containing the gene <i>FTN_1586</i>	This work
pFNLTP6 pgro- <i>FTL_1645</i>	pFNLTP6 pgro containing the gene <i>FTL_1645</i>	This work
pMP812	<i>sacB</i> suicide vector, Kan <sup>R</sup>	LoVullo <i>et al.</i> (2009)
pMP812- <i>FTL_1645</i> up/down	pMP812 containing the indel; Kan <sup>R</sup>	This work



129  
130

oligonucleotide	number	Sequence (5' to 3' direction)
5' pgro-Kan_F	p1	TTGTATGGATTAGTCGAGCTAAA
3' npt-Kan_R	p2	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG
5' FTN1586_upstreamF	p3	CAGATAGAATATCAGGTAGCGC
3' FTN1586_upstreamR	p4	TTTAGCTCGACTAATCCATACAACCTCAAGATTATGCTCGAAAAGC
5' FTN1586_downstreamF- <i>Pst</i> I	p5	AACTGCAGATGGCTTTGAGCAGCTTATAGC
3' FTN1586_downstreamR- <i>Sa</i> II	p6	ACGCGTCGACCTACAACCAGACCGGTATTTTC
SP6	p7	ATTTAGGTGACACTATAG
T7P	p8	TAATACGACTCACTATAGG
5' FTN_1586	p9	AGAGAGGTAATGAAGTTGTTG
3' FTN_1586	p10	CTCTAGCACCTTCAACGTTATC
5' pgro-F-SmaI	p11	TCCTACCCGGGTTGTATGGAT
3' pgro-R	p12	CTCTCTAATAATCAATCAGTTTATTGCACGACGAACTAATACTC
5' FTN_1586-F	p13	ATAAACTGATTGATTATTAG
3' FTN_1586-R-PstI	p14	GTGAACTGCAGCTTGTGTGTACCTTGATCTACAGCTAA
5' FTL_1645_upstreamF-BamHI	p15	TTCGGATCCTGATACGCACCTGTAAGTATTCT
3' FTL_1645_upstreamR	p16	CCACTTTTAGGATATGTATAACTGAAAATGTATTTTAGATATCTCAAC
5' FTL_1645_downstreamF	p17	TTTTCAGTTAATATCCTAAAAGTGGTTGGGTAGAACATG
3' FTL_1645_downstreamR-notI	p18	TAATAGCGGCCGCTAGCTCACGCTTTGTATCACGGGTAAT
5'race GSP1_FTN_1586	p19	GCATGATCTTTTTGACACCA
3'race GSP2_FTN_1586	p20	AATCTCAAGATTCTGCTGGAAG
5' qRT FTN_1585	p21	GGGACTAGTGC GTTCTGCTGA
3' qRT FTN_1585	p22	GCCAAGACCAACAAACGCAGG
5' qRT FTN_1586	p23	TGGGGTGGAATGCAAGCCGTC
3' qRT FTN_1586	p24	TTTACAGCAGCAATACCGCTT
5' qRT FTN_1587	p25	ACGGGGAACAGTTTTAGGAG
3' qRT FTN_1587	p26	TGTACGACCACTTGCAAAAGC
5' RT FTN_1585	p27	CAAGGTACAACAAGTTCACGAG
5' RT FTN_1587	p28	AGAGAGGTAATGAAGTTGTTG
3' RT FTN_1585	p29	CTCTAGCACCTTCAACGTTATC
3' RT FTN_1587	p30	CCCGAGCCCTAATTATAAATTC
5' FTL_1645 upstream	p31	TATCAGCTGCTTACCTCTTTTAGG
3' FTL_1645 downstream	p32	TGTGATGCTATCTCTTATGTGTTTAA

131  
132  
133

## Transport des acides aminés branchés et virulence de *Francisella tularensis*

Dans la deuxième partie de mon travail expérimental, nous avons choisi d'étudier un second transporteur prédit d'acides aminés de la sous-famille des Pht, désigné IleP (FTN\_1654 chez *F. novicida*).

L'importance du transporteur IleP dans la virulence des différentes sous-espèces de *Francisella* a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Jones et al., 2012; Marohn et al., 2012; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Qin and Mann, 2006; Weiss et al., 2007). *In vitro*, la délétion du gène *ileP* chez les souches SCHU S4, LVS ou U112 entraîne une diminution de la multiplication intracellulaire dans les cellules HepG2, les macrophages primaires murins et les macrophages murins J774 (Marohn et al., 2012; Qin and Mann, 2006). *In vivo*, la délétion du gène *ansP* entraîne une diminution de la virulence des souches U112 et LVS dans les drosophiles et la souris BALB/c (Marohn et al., 2012; Moule et al., 2010; Peng and Monack, 2010; Weiss, 2002).

Nos travaux ont permis de mettre en évidence, chez *F. novicida*, un fort défaut de croissance en milieu synthétique ainsi qu'une très forte atténuation de la virulence dans le modèle murin du mutant dans le gène codant pour IleP. Cette diminution de la croissance en milieu synthétique, indiquant un défaut de transport d'un ou de plusieurs acides aminés présents dans le milieu synthétique, est abolie par l'ajout de thréonine. Chez une souche sauvage de *F. novicida*, l'absence d'isoleucine, un des acides aminés du milieu synthétique, n'est pas délétère pour la croissance bactérienne uniquement dans le cas d'un milieu supplémenté par de la thréonine. En effet, il s'avère que la thréonine est un substrat permettant la synthèse des acides aminés branchés, la leucine, l'isoleucine et la valine. Par la suite, des expériences de transport d'acides aminés ont permis de mettre en évidence le transport d'isoleucine et de leucine par IleP.

A l'inverse, chez *F. tularensis* subsp *holarctica*, la voie de biosynthèse de l'isoleucine via la thréonine n'étant pas présente, la bactérie est totalement dépendante d'un apport extérieur en isoleucine.

Cette étude nous a permis d'illustrer deux aspects de la virulence nutritionnelle de *F. tularensis*. D'une part, nous avons pu mettre en évidence l'importance de la captation des acides aminés branchés, à la fois pour la sortie rapide du phagosome et pour la multiplication intracellulaire de *F. tularensis*. D'autre part, la mise en lumière de la perte de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés via la thréonine chez les sous-espèces les plus virulentes de *F. tularensis* (sous-espèces *tularensis* et *holarctica*), illustre bien le phénomène d'adaptation à l'hôte par réduction du génome qu'utilisent de nombreuses bactéries intracellulaires.

Importance of branched-chain amino acid utilization in *Francisella*  
intracellular adaptation

Gael Gesbert <sup>1,2</sup>, Elodie Ramond <sup>1,2</sup>, Fabiola Tros <sup>1,2</sup>, Julien Dairou <sup>3</sup>, Eric Frapy<sup>1,2</sup>,  
Monique Barel <sup>1,2</sup>, Alain Charbit <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Bâtiment Leriche.

<sup>2</sup> INSERM U1151 - CNRS UMR 8253, Institut Necker-Enfants Malades

Equipe 11: Pathogénie des Infections Systémiques, Paris, France

<sup>3</sup> Equipe RMCX Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie  
Fonctionnelle et Adaptative (BFA) UMR 8251 CNRS, F-75205, Paris, France.

Running title: Isoleucine uptake in *Francisella* virulence

Keywords: *Francisella tularensis*, amino acid uptake, nutrition, virulence.

Word count for the Abstract: 199

Word count for the Text: 5,953

\*Corresponding author: Alain CHARBIT; Bâtiment Leriche. 96 rue Didot 75993 Paris

Cedex 14 - France

e-mail: [alain.charbit@inserm.fr](mailto:alain.charbit@inserm.fr)

Tel.: 33 1 – 72 60 65 11 — Fax: 33 1 - 72 60 65 13

## ABSTRACT

Intracellular bacterial pathogens have adapted their metabolism to optimally utilize the nutrients available in infected host cells. We recently reported the identification of an asparagine transporter required specifically for cytosolic multiplication of *Francisella*. In the present work, we characterized a new member of the Major Super Family (MSF) of transporters, involved in isoleucine uptake. We show that this transporter (hereafter designated IleP) plays a critical role in intracellular metabolic adaptation of *Francisella*. Inactivation of IleP severely impaired intracellular *F. tularensis* subsp. *novicida* multiplication in all cell types tested and reduced bacterial virulence in the mouse model. Inactivation of IleP in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS provoked comparable intracellular growth defects, confirming the critical role of this transporter in isoleucine uptake. The data presented unravel, for the first time, the importance of isoleucine utilization for efficient phagosomal escape and cytosolic multiplication of *Francisella* and suggest that virulent *F. tularensis* subspecies have lost their branched-chain amino acids biosynthetic pathways to rely exclusively on dedicated uptake systems. This loss of function is likely to reflect an evolution toward a predominantly intracellular life style of the pathogen. Amino acid transporters should be thus considered as major players in the adaptation of intracellular pathogens.

## 2    **IMPORTANCE**

3

4    Intracellular pathogens have evolved to optimally utilize the nutrients available in infected  
5    host cells for their survival and multiplication. Some bacteria such as *Francisella tularensis*  
6    use amino acids as major carbon, nitrogen and energy sources. We show here that this  
7    bacterium critically relies on an isoleucine transporter (designated IleP) for phagosomal  
8    escape, intracellular multiplication and in vivo dissemination. The comparison of the role of  
9    IleP in two subspecies of *F. tularensis* suggest that virulent subspecies have lost their  
10   capacity to biosynthesize branched-chain amino acids to rely exclusively on uptake systems.  
11   This loss of function is likely to reflect an evolution toward a predominantly intracellular life  
12   style.

13

## 2 INTRODUCTION

3 *Francisella tularensis* is a Gram-negative bacterium causing the zoonotic disease tularaemia  
4 in a broad variety of animal species (37). Humans can be infected by this highly infectious  
5 pathogen by different means, including direct contact with sick animals, inhalation, insect  
6 bites or ingestion of contaminated water or food. Four different subspecies (subsp.) of *F.*  
7 *tularensis* that differ in virulence and geographic distribution exist, designated subsp.  
8 *tularensis*, *holartica*, *mediasiatica* and *novicida*, respectively. *F. tularensis* subsp. *novicida*  
9 (or *F. novicida*) is considered non-pathogenic for non-immunocompromized humans but is  
10 fully virulent for mice and is widely used as a model to study highly virulent subspecies.

11 *Francisella* virulence is tightly linked to its capacity to multiply intracellularly, in the  
12 cytosolic compartment of infected host cells (7, 34). Macrophages are one of the primary  
13 intracellular niches for *Francisella* survival in the host. Recent studies from our group (2, 12,  
14 32), and several others groups (23, 25, 36, 40), have highlighted the importance of nutrient  
15 acquisition and metabolic adaptations in *Francisella* pathogenesis. In particular, amino acids  
16 are thought to represent major sources of carbon and energy for *F. tularensis* (20, 31, 40).  
17 However, the mammalian cell cytosol contains variable amounts of amino acids. In particular,  
18 cells are auxotrophic for a number of amino acids, including Leu, Ile, Val and Thr (28) and  
19 must therefore rely mainly on their import from the sources available in the external  
20 medium.

21 Interestingly, a recent study has shown that *F. tularensis* was able to boost the intracellular  
22 levels of all amino acids by triggering the host macroautophagy degradation machinery (40).  
23 To utilize these intracellular sources of amino acids, *Francisella* is equipped with a battery of  
24 transporters, including numerous secondary transporters (20). Several other intracellular

2 pathogens have been shown recently to require amino acids as important carbon, energy and  
3 nitrogen sources (13, 14, 29, 33). For example, the two intravacuolar pathogens *Anaplasma*  
4 *phagocytophilum* and *Legionella pneumophila* have evolved with efficient strategies to boost  
5 the levels of host amino acids (1).

6 In *Legionella pneumophila*, the protein PhtA, a member of the subclass of Major Facilitator  
7 Superfamily of transporters designated Phagosomal transporters (Pht), is required for  
8 threonine uptake, in the Legionella-containing vacuole. The *L. pneumophila* genome encodes  
9 ten additional PhtA paralogues, some of which are also required during intracellular  
10 replication (11). PhtJ is required for acquisition of valine (35), whereas the roles of the *phtE*  
11 and *phtF* loci in *L. pneumophila* genome are currently unknown. Interestingly, PhtC and  
12 PhtD were very recently shown to contribute in protecting *L. pneumophila* from dTMP  
13 starvation (10). Thus, Pht proteins in *Legionella* contribute, not only to the assimilation of  
14 amino acids, but also to additional metabolic functions.

15 Phylogenetic studies revealed that PhtA orthologues were encoded by a variety of other  
16 bacterial genomes, but exclusively among intracellular pathogenic bacteria (6, 35). We have  
17 recently characterized the first member of the Pht family in *Francisella*, the asparagine  
18 transporter AnsP (12). Our study revealed that AnsP was required for asparagine assimilation  
19 by intracellular *Francisella* when the bacteria were present in the cytosolic compartment of  
20 infected cells, indicating that the functions of these transporters are not restricted to bacteria  
21 residing exclusively in a phagosomal compartment.

22  
23 In the present study we addressed the role of a second member of the Pht family, highly  
24 conserved in all the *Francisella* genomes, the protein FTN\_1654 in *F. novicida*. We chose to



focus on this putative amino acid transporter protein because the *FTN\_1654* gene has been repeatedly found in earlier genetic screens as required for replication of *F. novicida* *in vivo* (22, 25, 41). Moreover, its orthologue in *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (*FTT\_0056c*) has been shown to be required for normal bacterial replication in the hepatocytic human cell line HepG2 (30). Furthermore, inactivation of *FTL\_1803*, the orthologue of *FTN\_1654* in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, also resulted in altered replication in Hep G2 human hepatic cells and reduced virulence in the mouse (19). Transport function mediated by *FTN\_1654* thus appears to be important *in vitro* as well as *in vivo* and is not compensated by any other putative transporter encoded by the *Francisella* genome.

We show here that the protein *FTN\_1654* is an isoleucine transporter (hence designated IleP). IleP-mediated isoleucine uptake appear to be vital for bacterial intracellular multiplication and virulence, in both *F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Remarkably, genome comparisons suggest that specialization toward an intracellular lifestyle have led pathogenic *Francisella* subspecies to lose their branched-chain amino acid pathways to rely exclusively on transporter-mediated acquisition of these amino acids from the host.

## RESULTS

### **IleP, a new member of the Major Facilitator Superfamily (MFS) of transporters.**

The region of *ileP* (*FTN\_1654* in *F. novicida*) is highly conserved in all the *F. tularensis* subspecies (**Fig. 1A**). The IleP protein is also highly conserved and shares 99.3% identity with its orthologues in *F. tularensis* subsp. *holarctica* (*FTL\_1803*) and *F. tularensis* subsp.

*tularensis* (FTT\_0056c) (**Fig. S1**). Like most MFS members, IleP is predicted to comprise twelve transmembrane helices (**Fig. 1B**). The closest homologue in other bacterial species is LLO\_3121 of *Legionella longbeachae* (designated PhtJ) that shares 40.3% amino acid identity with the *Francisella* IleP proteins (**Fig. S1**). The conserved amino acids between the *Francisella* and *L. longbeachae* proteins are globally scattered along the protein sequence. Of note, the valine transporter PhtJ of *L. pneumophila* (Lpg1893) shares 47.2% and 33.3% amino acid identity with the *L. longbeachae* protein LLO\_3121 and FTTN\_1654, respectively. The *ileP* gene of *F. novicida* is predicted to constitute a single transcriptional unit, according to the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. We generated a chromosomal deletion of the *ileP* gene in *F. novicida* U112, by allelic replacement (see Materials and Methods). The deletion had no polar effect on the expression of the two flanking genes (**Fig. S2**).

We first evaluated the impact of the  $\Delta ileP$  deletion on bacterial growth in the Chemically Defined Medium optimized for *F. novicida* (CDM<sub>min</sub>), described in (12). The  $\Delta ileP$  mutant showed a severe growth defect in this medium and wild-type growth was restored in the  $\Delta ileP$ -complemented strain (**Fig 2A**). Supplementation of the CDM<sub>min</sub> with 0.5% casamino acids (**Fig 2B**) restored multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant to the wild-type level, suggesting that the growth defect of the  $\Delta ileP$  mutant in non-supplemented CDM<sub>min</sub> was due to impaired amino acid transport. Supplementation of the CDM<sub>min</sub> with a ten-fold excess of either a pool of essential amino acids (arginine, histidine, lysine, methionine, tyrosine, cysteine) or useful but non-essential amino acids (isoleucine, leucine, aspartic acid, serine, proline), failed to alleviate the growth defect of the  $\Delta ileP$  mutant (not shown). In contrast, CDM<sub>min</sub> supplementation with a pool of the nine non-essential amino acids (threonine, valine, alanine,

glutamate, glutamine, glycine, phenylalanine, tryptophane and asparagine) restored wild-type growth to the  $\Delta ileP$  mutant (**Fig 2C**). Therefore, we next supplemented the CDM<sub>min</sub> individually with each of the non-essential amino acid. Threonine was the only amino acid that restored growth of the  $\Delta ileP$  mutant to wild-type level (**Fig 2D**) at all the concentrations tested (**Fig 2E**).

Since threonine is non-essential for growth, we then reasoned that threonine could be used by the bacterium for the biogenesis of the amino acid(s) that could not be taken up by the  $\Delta ileP$  mutant. We therefore substituted individually each of the 11 amino acids present in the CDM<sub>min</sub> by threonine and monitored growth of the wild-type strain. Isoleucine was the only amino acid that could be replaced by threonine without altering normal growth of *F. novicida* (**Fig 2F**). Of note, *F. novicida* is equipped with an intact BCAA biosynthetic pathway (Fig. S3) that uses threonine as precursor for branched chain amino acids including isoleucine.

Interestingly, wild-type *F. novicida* in CDM<sub>min</sub> devoid of isoleucine was much less affected in growth than the  $\Delta ileP$  mutant in normal CDM (**Fig S4A**), suggesting that IleP might transport an additional substrate present in the CDM<sub>min</sub>. Furthermore, the fact that growth of the  $\Delta ileP$  mutant is similarly affected in CDM<sub>min</sub>, containing or not leucine (**Fig S4A**), supports the notion that IleP is not a major leucine transporter of *F. novicida*.

To confirm that IleP was indeed involved in isoleucine transport, we compared the uptake of radio-labeled isoleucine (<sup>14</sup>C-Ile) by wild-type *F. novicida* to that of the  $\Delta ileP$  mutant (**Fig 3A**). At isoleucine concentrations ranging from 2.5 to 25  $\mu$ M, <sup>14</sup>C-Ile incorporation was significantly affected in the  $\Delta ileP$  mutant (approximately 50% incorporation relative to the wild-type). The fact that isoleucine transport was not totally abolished in the  $\Delta ileP$  mutant, suggests that isoleucine could still enter via other transporter(s) in this strain. Isoleucine

belongs to the group of branched-chain amino acids (BCAA) that also comprises leucine and valine. Since isoleucine and leucine are both required for growth of *Francisella* in CDM<sub>min</sub>, we decided to measure the uptake of radioabeled leucine in wild-type *F. novicida* and in the  $\Delta ileP$  mutant (**Fig. 3B**). The uptake of <sup>14</sup>C-Leu was not affected at 2.5, 5 and 10  $\mu$ M leucine in the  $\Delta ileP$  mutant. Reduced uptake (app. 25% reduction as compared to wild-type) was only observed at the highest leucine concentration (25  $\mu$ M). Altogether, these assays revealed that IleP is mainly involved in isoleucine transport.

**IleP is required for intracellular multiplication and virulence.** We first examined the ability of wild-type *F. novicida* (WT), and  $\Delta ileP$  strains to survive and multiply in murine macrophage-like J774-1 cells (**Fig. 4A, B**). In standard DMEM, the intracellular multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant was essentially identical to that of wild-type *F. novicida* (**Fig. 4A**). In contrast, in DMEM containing limiting concentrations of threonine (**Fig. 4B**), multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant was severely impaired as compared to the wild-type. After 24 h, cells infected with the  $\Delta ileP$  mutant showed a 150-fold reduction of intracellular bacteria in DMEM supplemented with 8  $\mu$ M or 0.8  $\mu$ M threonine, compared to cells infected with the wild-type strain; and a 300-fold reduction in DMEM without threonine (**Fig. 4B**). Of note, in Hep G2 human hepatocytic cells, the *F. novicida*  $\Delta ileP$  mutant showed a 3-fold reduction of intracellular bacteria after 10 h, and a 10-fold reduction after 24 h in standard DMEM compared to the number of wild-type bacteria at same time points (**Fig S5**). Constitutive expression of the wild-type gene *ileP* (carried on pKK-pgro-*ileP*) restored normal intracellular replication. The fact that the  $\Delta ileP$  failed to multiply normally in Hep G2

cells under threonine-replete conditions (800  $\mu$ M threonine) could be due, for example, to a limiting intracellular pool of threonine in this cell line.

**Subcellular localization.** We followed the subcellular localization of the  $\Delta ileP$  mutant in infected cells, under limiting threonine concentration (8  $\mu$ M; see Material and Methods). Intracellular localization of the bacteria or LAMP-1 (used as a specific marker of phagosomes) was analyzed using specific antibodies and their co-localization was monitored at 3 time-points (1 h, 4 h and 10 h post-infection; **Fig. 4C**). Quantification of each co-localization was performed with the Image J software (**Fig. 4D**). In cells infected with wild-type *F. novicida*, co-localization of bacteria with LAMP-1 was only around 10% after 1 h and remained in the same range throughout the infection, showing that most bacteria escape the phagosome rapidly. In contrast, approximately 80% of  $\Delta ileP$  mutant bacteria co-localized with LAMP-1 after 1 h of infection. After 4 h, 60% co-localization was still observed which decreased to 21% after 10 h infection. These data suggest that, after 10 h, most of the  $\Delta ileP$  mutant bacteria had escaped in the host cytosol. However, after 24 h (**Fig. 4B**), the number of  $\Delta ileP$  mutant bacteria remained 1,000-fold lower than that of the wild-type (*i.e.* approximately at the same level as that recorded at the beginning of the infection), implying that *ileP* inactivation affected both phagosomal escape and cytosolic multiplication.

**Virulence.** To investigate the fate of the bacteria inside host tissues, groups of five female BALB/c mice were infected intraperitoneally (ip) with either the wild-type *F. novicida* or the  $\Delta ileP$  mutant strain (**Fig. 4E**) and we monitored the number of viable bacteria in the spleen and liver. The numbers of viable bacteria were determined 72 hours after infection by plating diluted tissue homogenates. The number of wild-type bacteria reached about  $10^8$  bacteria per organ. In contrast,  $\Delta ileP$  mutant bacteria were detected in both the spleen and liver at

significantly lower levels (approximately 10,000-fold less viable mutant bacteria were recorded in the spleen; and 100-fold less bacteria in the liver than of the wild-type strain). All the mice infected with the wild-type strain succumbed after four days. In contrast, all the mice infected with the *ΔileP* mutant survived and the number of viable bacteria in the organs at day 6 had decreased moderately to approximately 3.4 log<sub>10</sub> and 4.5 log<sub>10</sub>, in the spleen and liver, respectively (not shown). These data demonstrate that the virulence of the *ΔileP* mutant is highly attenuated in mice and that the mutant is able to persist for some period of time in the infected organs.

**IleP of *F. tularensis* LVS is required for intracellular survival under isoleucine limiting conditions.** We next constructed a chromosomal deletion mutant (*ΔFTL\_1803*) in *F. tularensis* LVS and evaluated its impact on intracellular multiplication. We first evaluated the impact of the mutation in standard CDM (5) (**Fig. 5**). Growth of the LVS *ΔileP* mutant (*ΔFTL\_1803*) was only slightly affected in standard CDM (containing 1.5 mM isoleucine). Remarkably, under limiting isoleucine conditions (0.15 mM), multiplication of wild-type LVS was essentially not affected whereas that of the mutant was almost totally abolished (in spite of the presence of threonine in the medium) (**Fig. 5A**). Indeed, both *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS and virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4, possess a defective branched-chain amino acid biosynthetic pathway (**Fig. 6**). Hence, in contrast to *F. novicida*, these subspecies are unable to biosynthesize branched-chain amino acids from threonine.

We next followed the kinetics of intracellular multiplication of the wild-type *F. tularensis* LVS and its *ΔileP* derivative (**Fig. 5B, C**). In standard DMEM, the *ΔileP* mutant of LVS

showed no significant defect in intracellular multiplication in J774.1 macrophages. In contrast, the *ΔileP* mutant showed a significant reduction of intracellular multiplication after 24 h as compared to parental LVS, under isoleucine limiting conditions (100-fold decrease in number of mutant relative to wild-type bacteria at 80  $\mu$ M; **Fig. 5C**).

The intracellular multiplication of the *ΔileP* mutant was also impaired in THP-1 macrophages as compared to wild-type LVS, under isoleucine limiting conditions (**Fig. 5D**).

Confocal microscopy analyses of the LVS *ΔileP* mutant fully supported those obtained with the *F. novicida* *ΔileP* mutant (**Fig. 5E, F**). Indeed, 78% of *ΔileP* bacteria co-localized with LAMP-1 after 1 h of infection, and 50% co-localization was still observed after 4 h. Co-localization of wild-type LVS with LAMP-1 was only around 52% after 1 h and decreased to 10% throughout the infection.

These results confirmed that *ileP* inactivation affected both phagosomal escape and cytosolic multiplication in the two *F. tularensis* subspecies.

**Metabolic analyses.** *L. pneumophila* has been shown to trigger an important entry of amino acids upon infection of Human Embryonic Kidney cells (28). This prompted us to evaluate the impact of *F. tularensis* LVS infection on the intracellular pools of BCAA (isoleucine, leucine and valine), in THP-1 human monocytes. Comparative measurements of free amino acids in lysates of THP-1 macrophages (**Fig. S6**) showed that at 1 h post-infection, wild-type LVS triggered a significant rise in the concentration of each of the BCAA (*i.e.* 13-fold, 10-fold and 17-fold for isoleucine, leucine and valine, respectively). Remarkably, after 24 h, the concentration of all three BCAA significantly decreased, reaching 2- to 3-fold that of non-infected cells. In THP-1 infected with a non-replicating *iglC* mutant of LVS, the

increase in intracellular BCAA concentrations recorded at 1 h was approximately half that of the wild-type strain; and after 24 h, the BCAA concentrations were only moderately reduced (notably for Ile, at 5-fold that of non-infected cells).

## DISCUSSION

We characterized a new MFS transporter of *Francisella*, involved in isoleucine uptake (IleP) and required for bacterial virulence. Inactivation of IleP severely impaired intracellular multiplication of both *F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, in all cell types tested.

Importantly, the data presented unravel for the first time the importance of isoleucine utilization for efficient phagosomal escape and cytosolic multiplication of *Francisella* and suggest that virulent *F. tularensis* subspecies have lost their branched-chain amino acids biosynthetic pathways to rely exclusively on dedicated uptake systems.

### **Importance of isoleucine in phagosomal egress and cytosolic multiplication.**

The branched-chain amino acids (BCAAs) are among the nine essential amino acids for humans and therefore must be supplied in the diet. The BCAA concentration in human blood serum is relatively high (in the 100  $\mu$ M range; (16). In contrast, the BCCA concentration in the cytosol of human cells in culture is variable and critically depends on their concentration in the growth medium (26). In host tissues, BCAA distribution is unknown but is likely to be quite variable and also dependent on available external sources.

BCAA metabolism lies at the crossroads of several other bacterial metabolic pathways. For example, BCAA and fatty acid catabolism is used for ATP and energy production by many



2 proteobacteria (15). In *Francisella* however, BCAA degradation pathways are predicted to be  
3 non-functional (according to the KEGG database). This suggests that BCAAs may be mainly  
4 used for protein synthesis in these species.

5 We have recently shown that infection of human macrophages by *Francisella* triggered the  
6 rapid upregulation of the neutral amino acid transporter SLC1A5 (Solute Carrier Family 1,  
7 member 5) and the concomitant down-regulation of SLC7A5 (3). This up-regulation was  
8 assumed to stimulate the entry of amino acids. Here, we found that *F. tularensis* LVS  
9 triggered the uptake of important amounts of BCAAs upon entry into THP-1 macrophages,  
10 further suggesting that the bacterium has evolved a strategy of host cell manipulation to  
11 obtain amino acids in sufficient amounts for its optimal intracellular multiplication.  
12 Strikingly, the intracellular BCAA concentration sharply increased after 1 h of infection and  
13 was followed by a strong decrease after 24 h, suggesting that these amino acids have been  
14 consumed during the course of intracellular bacterial multiplication. One may imagine that  
15 this rapid supply of amino acids is particularly useful for *Francisella* in the phagosome to  
16 promote protein synthesis. The fact that, in cells infected with the non-replicating *iglC* mutant,  
17 the levels of the BCAAs after 1 h and 24 h varied only moderately further supports the notion  
18 that these amino acids have been utilized by multiplying bacteria.

19 Napier *et al.* recently showed that biotin biosynthesis was required in the phagosome to  
20 promote rapid bacterial escape (23), thus providing the first example of a metabolic  
21 requirement of *Francisella* in this compartment.

22 The phagosome into which *Francisella* transiently resides (less than 30 minutes) is a very  
23 dynamic entity (8). Hence, its composition is likely to be continuously changing from its  
24 initial formation until its disruption. One can imagine that a rapid bacterial adaptation to the

2 available metabolites present in the phagosome may play an important role in phagosomal  
3 egress, notably by promoting efficient protein syntheses (including of factors involved in  
4 phagosomal disruption).

5 Interestingly, a recent study from Herskovits and co-worker (17) revealed that several  
6 biosynthetic pathways were induced during *L. monocytogenes* growth in macrophage cells,  
7 including the BCAA pathway, suggesting that limited amounts of isoleucine, leucine and  
8 valine, are available in the host cytosol. The authors demonstrated that the isoleucine  
9 responsive regulator CodY was responsible for the up-regulation of *L. monocytogenes*  
10 virulence genes under these conditions, suggesting that the low intracellular concentrations of  
11 BCAAs might serve as signal for the bacteria to “sense” its intracellular location. *F.*  
12 *tularensis* genomes do not encode any CodY orthologue. However, it cannot be excluded that  
13 intracellular isoleucine concentration might influence *Francisella* genes expression via yet  
14 unknown sensory mechanisms.

## 15 **The BCCA pathway, a prototypic example of pathoadaptation?**

16 Independently of their subcellular multiplication niches, intracellular bacterial pathogens  
17 generally possess smaller genomes than their related non-pathogenic relatives, as a result of  
18 reductive genome evolution (4). This evolutionary process is associated with the loss of many  
19 pathways. Accordingly, the maximal genome reduction has been observed for obligate  
20 intracellular bacteria (21). Indeed, *Chlamydiaceae* are auxotrophic for most amino acids,  
21 cofactors, and for purine and pyrimidine nucleotides (24) and references therein).  
22 Consequently, they rely on the import of these host-derived compounds, but only very few  
23 transport proteins have been characterized functionally in these species.

24 A recent study, combining proteomics, mutant analyses and computational approaches

revealed that *Salmonella* virulence depended on the simultaneous exploitation of numerous different host nutrients, including vitamins, carbohydrates and amino acids (39). Comparisons of the predicted nutrient utilization and biosynthetic pathways of a series of other mammalian pathogens confirmed that most pathogens shared the capability to utilize multiple nitrogen and carbon sources. Furthermore, the systematic prediction of biosynthetic pathways commonly lost during the specialization toward pathogenesis, revealed that many pathogens lost the capacity to biosynthesize several amino acids, consistent with the notion that pathogenic species obtain such nutrients from the host. For example, *L. pneumophila* is auxotrophic for several amino acids (including Cys, Met, Arg, Thr, Val, Ile, Leu, Phe, and Tyr (9, 27) and thus absolutely depends on efficient strategies to acquire them from the host. Remarkably, although *Mycobacterium tuberculosis* is prototrophic for all twenty amino acids it still relies on two membrane transporters to capture aspartate and asparagine to exploit these amino acids as a nitrogen source during infection (13, 14). Thus, bacteria may favor amino acid uptake to biosynthesis, not only for obvious energetic reasons, but also because it offers a simple and rapid mean to adapt to changing environments.

BCAAs are among the most abundant amino acids in proteins, and maintaining their pools is, thus, a prerequisite for high-level synthesis of proteins (38). Fully supporting this notion, we found that the percentage of leucine and isoleucine in *F. novicida* proteins (9.7% and 9.4%, respectively) was also approximately twice higher than that of the other amino acids (**Table S2**). Notably, 42.3% of the proteins contain  $\geq 10\%$  leucine and 36.3%  $\geq 10\%$  isoleucine (not shown). Our genome comparisons suggest that the pathogenic subspecies *holarctica* and *tularensis* of *F. tularensis* have lost the capacity to biosynthesize BCAA (**Fig. 6**), and thus

require efficient dedicated uptake systems to survive the limiting isoleucine conditions they may encounter during a mammalian infection.

In conclusion, the analysis of IleP in *F. novicida* and *F. tularensis* LVS revealed the conserved importance of isoleucine acquisition in *Francisella* pathogenesis. Our study also highlighted the importance of the cell growth conditions (in particular the utilization of carbon and nitrogen sources) to study the function of transporters in different subspecies. It is likely that a number of other nutrients and dedicated transporters, important for *Francisella* intracellular survival, still need to be discovered and functionally characterized.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics Statement.** All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with guidelines established by the French and European regulations for the care and use of laboratory animals (Decree 87–848, 2001–464, 2001–486 and 2001–131 and European Directive 2010/63/UE) and approved by the INSERM Ethics Committee (Authorization Number: 75-906).

**Bacterial strains and plasmids.** *F. tularensis* subsp. *novicida* (or *F. novicida*) strain U112, *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain LVS (kindly provided by A. Sjostedt) and their derivatives were grown in liquid: i) on Schaedler broth (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), ii) Tryptic Soy broth supplemented with cysteine (Becton, Dickinson and company), or iii) Chamberlain chemically defined medium (CDM) (5). Bacteria were grown on solid media on: i) pre-made chocolate agar PolyViteX (BioMerieux SA Marcy l'Etoile, France), or ii) chocolate plates prepared from GC medium base, IsoVitalex vitamins and haemoglobin (BD

Biosciences, San Jose, CA, USA), at 37°C.

All bacterial strains, plasmids, and primers used in this study are listed in **Table S1**.

**Bioinformatic analyses.** Secondary structure predictions were performed using the program HMM<sup>TM</sup> (available at the internet site <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) and TMRPres2D for visual representation of transmembrane protein models (available at the internet site <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D>).

**Construction of chromosomal deletion mutants.** We inactivated the gene *ileP* in wild-type *F. novicida* strain U112 (*FTN\_1654*) and in wild-type *F. tularensis* strain LVS, by allelic replacement resulting in the deletion of the entire gene (from the start codon to the stop codon). For this, we used the counter selectable plasmid pMP812 (18). The recombinant plasmid pMP812- $\Delta$ *FTN\_1654* was constructed by overlap PCR. Primers p1 and p2 amplified the 1,046 bp region upstream of position +1 of the *FTN\_1654* coding sequence, and primers p2 and p3 amplified the 1,089 bp region immediately downstream of the *FTN\_1654* stop codon (Table S1). Primers p2/p3 have an overlapping sequence of 20 nucleotides, resulting in complete deletion of the *FTN\_1654* coding sequence after cross-over PCR. PCR reactions with primers p1/p2 and p3/p4 were performed with exTaq polymerase (Fermentas). The products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, CA). 200  $\mu$ M of each was used as a template for PCR with primers p1/p4 and treated with 30 cycles of PCR (94°C for 30 s, 54°C for 30 s and 72°C for 120 s). The gel-purified 2,135 bp fragment was digested with *Bam*HI and *Not*I (New England Biolabs) and cloned into *Bam*HI-*Not*I digested pMP812 (18). The plasmid was introduced into *F. novicida* U112 by electroporation. *F. tularensis* U112 was grown to OD<sub>600</sub> 0.3–0.6 in Schaedler-K3 broth; bacteria were collected and washed twice with 0.5 M sucrose. Bacteria were suspended in 0.5 M sucrose and 200  $\mu$ L

were used immediately for electroporation in a 0.2 cm cuvette (2.5 kV, 25 mF, 600 W). After electroporation, bacteria were mixed with 1 mL of Schaedler-K3 broth and incubated at 37°C for 3 h before selection on chocolate agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 5 µg mL<sup>-1</sup> Kan. Colonies appeared after 3 days of incubation at 37°C and were subsequently passed once on plates with selection, followed by a passage in liquid medium without selection (to allow recombination to occur). Next, bacteria were passed once on agar plates containing 5% sucrose. Isolated colonies were checked for loss of the wild-type *FTN\_1654* gene by size analysis of the fragment obtained after PCR using primers combination p1/p4, p5/p4 and p1/p6. One colony harboring a *FTN\_1654* deletion, as determined by PCR analysis, was used for further studies. Genomic DNA was isolated and used as the template in a PCR with primers p5/p6.

The mutant strains were checked for loss of the corresponding wild-type genes by PCR sequencing (GATC Biotech), using specific primers.

We also generated a chromosomal deletion of the gene orthologous to *F. novicida ileP* in *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain LVS (*FTL\_1803*). We used the recombinant plasmid pMP812- $\Delta$ *FTN\_1654* (previously used to create the  $\Delta$ *FTN\_1654* deletion). The plasmid was introduced into *F. tularensis* LVS by cryotransformation. *F. tularensis* was grown in chocolate agar overnight and washed in 0.2 M KCl. After centrifugation, the culture was suspended in 1 ml of transformation buffer (0.2 M MgSO<sub>4</sub>, 0.02 M Tris acetate, pH 7.5). 200 µl of this cell suspension was mixed with 4 µl of plasmid DNA (1 ng mL<sup>-1</sup>). The mixture was incubated 10 min at room temperature, immersed for 5 min in liquid nitrogen and then incubated at 37°C for 5 min. After cryotransformation, the suspension was incubated 6 h at 37°C with 1 mL of tryptic soy broth, before selection on chocolate agar (Bio-Rad, Hercules,

CA, USA) and 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Kan. Colonies appeared after 3 days of incubation at 37°C and were subsequently passed once on plates with selection, followed by a passage in liquid medium without selection. The rest of the procedure was identical to that used for the *F. novicida* mutant described above.

**Functional complementation.** The plasmid used for complementation of the *F. novicida*  $\Delta ileP$  mutant ( $\Delta FTN_{1654}$ ), pKK214-*pgro*-*FTN*<sub>1654</sub> was constructed by overlap PCR. Primers p9/p10 amplified the wild-type *FTN*<sub>1654</sub> gene (1,305 bp), and the primers p7/p8 amplified the 333 bp of the *pgro* promoter. Primers p8/p10 have an overlapping sequence of 20 nucleotides. PCR reactions with p9/p10 and p7/p8 primer pairs were performed with exTaq polymerase (Fermentas) and the products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, CA). 200  $\mu\text{M}$  of each amplification product was used as a template for PCR with primers p11/p13 and treated with 30 cycles of PCR (94°C for 30 s, 54°C for 30 s and 72°C for 120 s). The gel-purified 1,638 bp fragment was digested with *Sma*I and *Pst*I (New England Biolabs) and cloned into *Sma*I-*Pst*I-digested pKK214. The plasmids pKK214 (empty plasmid) and pKK214-*pgro*-*FTN*<sub>1654</sub> (complementing plasmid) were introduced into U112 and the *F. novicida*  $\Delta ileP$  mutant ( $\Delta FTN_{1654}$ ) by electroporation. The same plasmid was used for complementation of the *F. tularensis* LVS  $\Delta ileP$  mutant ( $\Delta FTL_{1803}$ ).

**Growth kinetics in broth.** Stationary-phase bacterial cultures of wild-type *F. novicida* U112 or LVS and U112  $\Delta ileP$  or LVS  $\Delta ileP$  mutants strains were diluted at a final OD<sub>600</sub> of 0.1 in tryptic soy broth (TSB) or CDM. The OD<sub>600</sub> of the culture was measured every hour during an 8 h-period. *F. tularensis* LVS and its isogenic mutant were grown in standard

Chamberlain medium (CDM) while *F. novicida* and its isogenic mutant were grown in the optimized CDM (devoid of threonine and valine; 12).

**Isolation of total RNA.** Bacteria were centrifuged for 2 min in a microcentrifuge at room temperature, and the pellet was quickly resuspended in Trizol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA). Samples were either processed immediately or frozen and stored at 80°C. Samples were treated with chloroform, and the aqueous phase was used in the RNeasy Cleanup protocol (Qiagen, Valencia, CA) with an on-column DNase digestion of 30 min.

**Quantitative real-time RT-PCR.** *F. tularensis* U112 and the U112 $\Delta$ *ileP* mutant strain were grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in Schaedler-K3 broth. After 4 h of incubation, samples were harvested and RNA was isolated. One microgram of RNA was reverse transcribed using random hexamers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) according to the protocol provided by the manufacturer. Real-time RT-PCR was performed with gene-specific primers using an ABI PRISM 7700 and SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). To calculate the amount of gene-specific transcript, a standard curve was plotted for each primer set using a series of diluted genomic DNA from U112. The amounts of *FTN\_1654*, *FTN\_1653*, and *FTN\_1655* transcripts were normalized to the helicase gene (*FTN\_1594*) transcript, whose expression is only slightly changed during growth.

**Transport assays.** Bacteria were grown in Chamberlain medium to mid-exponential phase and then harvested by centrifugation and washed twice with Chamberlain without amino acid. Bacteria were suspended at a final OD<sub>600</sub> of 0.5 in the same medium containing 50 mg mL<sup>-1</sup> of chloramphenicol. After 15 min of pre-incubation at 25°C, uptake was started by the addition of either L-[U-<sup>14</sup>C] isoleucine or L-[U-<sup>14</sup>C] leucine (Ile, Leu, Perkin Elmer), at



various concentrations (ranging from 1 to 100  $\mu$ M). The radiolabeled  $^{14}\text{C}$ -aminoacids were at a specific activity of 7.4 GBq mmol<sup>-1</sup>. Samples (100  $\mu$ L of bacterial suspension) were removed at regular intervals and collected by vacuum filtration on membrane filters (Millipore type HA, 25 mm, 0.22  $\mu$ m) and rapidly washed with Chamberlain without amino acid (2 x 5 mL). At the end of each experiment, the filters were transferred to scintillation vials and counted in a Hidex 300 scintillation counter. The counts per minute (c.p.m.) were converted to picomoles of amino acid taken up per sample, using a standard derived by counting a known quantity of the same isotope under similar conditions.

**Multiplication in macrophages.** J774.1 (ATCC TIB67), THP-1 (ATCC TIB- 202) and Hep G2 (ATCC HB 8065) cells were propagated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum. Cells were seeded at a concentration of 2 x 10<sup>5</sup> cells per well in 12-well cells tissue plates, and monolayers were used at 24 h after seeding. J774.1, THP-1 and Hep G2 monolayers were incubated for 60 min at 37°C with the bacterial suspensions (multiplicity of infection of 100 for J774.1 and THP-1; 1,000 for Hep G2) to allow the bacteria to enter. After washing (time zero of the kinetic analysis), the cells were incubated in fresh culture medium containing gentamicin (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) to kill extracellular bacteria.

At several time points, cells were washed three times in DMEM, macrophages were lysed by addition of water and the titer of viable bacteria released from the cells was determined by spreading preparations on chocolate agar plates. For each strain and time in an experiment, the assay was performed in triplicate. Each experiment was independently repeated at least three times, and the data presented originate from one typical experiment. For  *$\Delta$ ileP* suppression experiments, amino acids were added to 3 mM at the time of infection and

maintained throughout the infection.

**Confocal experiments.** Co-localization experiments were performed in J774-1 cells.

With *F. novicida*, macrophages were grown in DMEM containing 8  $\mu$ M threonine; and with

*F. tularensis* LVS, macrophages were grown in DMEM containing 80  $\mu$ M isoleucine.

Cells were infected with wild-type or the isogenic  $\Delta ileP$  mutant for 1 h and 10 h at 37°C, and

were washed in KHM (110 mM potassium acetate, 20 mM Hepes, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). For each

time point, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) for 15 min, quenching was realized

with NH<sub>4</sub>Cl for 10 min and cells were permeabilized and blocked with 0.1% saponine, 5%

goat serum in PBS for 10 min. All antibodies were diluted in the same mix and all steps were

separated by PBS washing. Monolayers were then incubated with anti *F. tularensis* subsp.

*novicida* mouse monoclonal antibody (Creative diagnostics) diluted 1:500 and anti LAMP-1

rabbit monoclonal antibody (Abcam), diluted 1:250, for 30 min at room temperature followed

with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Abcam) and donkey anti-rabbit Alexa fluor 546

(Abcam), both diluted 1:400, for 30 min. Monolayers were then incubated 1 min in DAPI

diluted 1:1000 in PBS. Coverslips were washed in PBS and in demineralized water and then

mounted in Mowiol.

Cells were examined using an X63 oil-immersion objective on a LeicaTSP SP5 confocal

microscope. Co-localization tests were performed by using Image J software; and mean

numbers were calculated on more than 500 cells for each condition. Confocal microscopy

analyses were performed at the Cell Imaging Facility (Faculté de Médecine Necker Enfants-

Malades).

**Mice infections.** Wild-type *F. novicida* and mutant strains were grown in TSB to

exponential growth phase and diluted to the appropriate concentrations. Six- to 8-week-old

female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St Isle, France) were intraperitoneally (i.p.) inoculated with 200 µl of bacterial suspension. The actual number of viable bacteria in the inoculum was determined by plating dilutions of the bacterial suspension on chocolate plates. After 3 or 6 days, mice were sacrificed. Homogenized spleen and liver tissue from each mouse were diluted and spread onto chocolate agar plates.

#### **Intracellular amino acid quantification assays.**

Ten millions THP-1 cells in RPMI were infected by LVS for 1 h as previously described (3). After washing with RPMI containing 10 µg/ml gentamycin, cells were further incubated at 37°C for 24 h. Cells were then pelleted and immediately frozen in liquid nitrogen. They were then submitted to amino acid quantification.

Amino acids detection and quantification was done with the standard procedure of Agilent using ZORBAX Eclipse AAA high as HPLC column. Briefly, the samples and the amino acid standard solutions were automatically derivatized with OPA by programming the robotic auto sampler. After derivatization, an amount equivalent to 10 or 20 µL of each sample was injected on a Zorbax Eclipse-AAA column, 5 µm, 150 × 4.6 mm (Agilent), at 40°C, with fluorescence detection. Aqueous mobile phase was 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, adjusted to pH 7.8 with NaOH, while organic mobile phase was acetonitrile/methanol/ water (45/45/10 v/v/v). The separation was obtained at a flow rate of 2 mL/min with a gradient program that allowed for 2 min at 0% B followed by a 16-min step that raised eluent B to 60%. Then washing at 100% B and equilibration at 0% B was performed in a total analysis time of 38 min.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr A. Sjostedt for providing the *Francisella* strains U112 and LVS. We thank Karin Meibom for helpful comments and suggestions on the manuscript. These studies were supported by INSERM, CNRS and Université Paris Descartes Paris Cité Sorbonne. Gael Gesbert was funded by a fellowship from the “Délégation Générale à l’Armement” (DGA) and Elodie Ramond by a fellowship from the “Région Ile de France”. We acknowledge the technical platform “Bioprofiler” for provision of HPLC chromatography facilities.

## REFERENCES

1. **Abu Kwaik, Y., and D. Bumann.** 2013. Microbial quest for food in vivo: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cell Microbiol* **15**:882-890.
2. **Alkhuder, K., K. L. Meibom, I. Dubail, M. Dupuis, and A. Charbit.** 2009. Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* **5**:e1000284.
3. **Barel, M., K. Meibom, I. Dubail, J. Botella, and A. Charbit.** 2012. *Francisella tularensis* regulates the expression of the amino acid transporter SLC1A5 in infected THP-1 human monocytes. *Cell Microbiol* **14**:1769-1783.
4. **Bliska, J. B., and A. Casadevall.** 2009. Intracellular pathogenic bacteria and fungi--a case of convergent evolution? *Nat Rev Microbiol* **7**:165-171.
5. **Chamberlain, R. E.** 1965. Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol* **13**:232-235.

- 2 6. **Chen, D. E., S. Podell, J. D. Sauer, M. S. Swanson, and M. H. Saier, Jr.** 2008. The  
3 phagosomal nutrient transporter (Pht) family. *Microbiology* **154**:42-53.
- 4 7. **Chong, A., and J. Celli.** 2010. The *Francisella* intracellular life cycle: toward  
5 molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front Microbiol*  
6 **1**:138.
- 7 8. **Clemens, D. L., B. Y. Lee, and M. A. Horwitz.** 2005. *Francisella tularensis* enters  
8 macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* **73**:5892-  
9 5902.
- 10 9. **Eylert, E., V. Herrmann, M. Jules, N. Gillmaier, M. Lautner, C. Buchrieser, W.**  
11 **Eisenreich, and K. Heuner.** 2010. Isotopologue profiling of *Legionella*  
12 *pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem*  
13 **285**:22232-22243.
- 14 10. **Fonseca, M. V., J. D. Sauer, S. Crepin, B. Byrne, and M. S. Swanson.** 2014. The  
15 *phtC-phtD* Locus Equips *Legionella pneumophila* for Thymidine Salvage and  
16 Replication in Macrophages. *Infect Immun* **82**:720-730.
- 17 11. **Fonseca, M. V., and M. S. Swanson.** 2014. Nutrient salvaging and metabolism by  
18 the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol* **4**:12.
- 19 12. **Gesbert, G., E. Ramond, M. Rigard, E. Frapy, M. Dupuis, I. Dubail, M. Barel, T.**  
20 **Henry, K. Meibom, and A. Charbit.** 2014. Asparagine assimilation is critical for  
21 intracellular replication and dissemination of *Francisella*. *Cell Microbiol* **16**:434-449.
- 22 13. **Gouzy, A., G. Larrouy-Maumus, T. D. Wu, A. Peixoto, F. Levillain, G. Lugo-**  
23 **Villarino, J. L. Guerquin-Kern, L. P. de Carvalho, Y. Poquet, and O. Neyrolles.**

2013. *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate. *Nat Chem Biol* **9**:674-676.
14. **Gouzy, A., Y. Poquet, and O. Neyrolles.** 2013. A central role for aspartate in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:68.
15. **Kazakov, A. E., D. A. Rodionov, E. Alm, A. P. Arkin, I. Dubchak, and M. S. Gelfand.** 2009. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J Bacteriol* **191**:52-64.
16. **Krasnova, I. N., V. Cherkas Iu, T. V. Denisenko, and L. A. Kartsova.** 1999. [A quantitative analysis of amino acids in blood serum by isocratic reverse-phase HPLC]. *Klin Lab Diagn*:11-14.
17. **Lobel, L., N. Sigal, I. Borovok, E. Ruppin, and A. A. Herskovits.** 2012. Integrative genomic analysis identifies isoleucine and CodY as regulators of *Listeria monocytogenes* virulence. *PLoS Genet* **8**:e1002887.
18. **LoVullo, E. D., C. R. Molins-Schneekloth, H. P. Schweizer, and M. S. Pavelka, Jr.** 2009. Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis*. *Microbiology* **155**:1152-1163.
19. **Marohn, M. E., A. E. Santiago, K. A. Shirey, M. Lipsky, S. N. Vogel, and E. M. Barry.** 2012. Members of the *Francisella tularensis* phagosomal transporter subfamily of major facilitator superfamily transporters are critical for pathogenesis. *Infect Immun* **80**:2390-2401.
20. **Meibom, K. L., and A. Charbit.** 2010. *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol* **1**:140.

21. **Merhej, V., K. Georgiades, and D. Raoult.** 2013. Postgenomic analysis of bacterial pathogens repertoire reveals genome reduction rather than virulence factors. *Brief Funct Genomics* **12**:291-304.
22. **Moule, M. G., D. M. Monack, and D. S. Schneider.** 2010. Reciprocal analysis of *Francisella novicida* infections of a *Drosophila melanogaster* model reveal host-pathogen conflicts mediated by reactive oxygen and imd-regulated innate immune response. *PLoS Pathog* **6**:e1001065.
23. **Napier, B. A., L. Meyer, J. E. Bina, M. A. Miller, A. Sjostedt, and D. S. Weiss.** 2012. Link between intraphagosomal biotin and rapid phagosomal escape in *Francisella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:18084-18089.
24. **Omsland, A., B. S. Sixt, M. Horn, and T. Hackstadt.** 2014. Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiol Rev.*
25. **Peng, K., and D. M. Monack.** 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* **78**:2723-2733.
26. **Piez, K. A., and H. Eagle.** 1958. The free amino acid pool of cultured human cells. *J Biol Chem* **231**:533-545.
27. **Price, C., A. Richards, J. Von Dwingelo, H. Samara, and Y. Abu Kwaik.** 2014. Amoeba host-Legionella synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution. *Environ Microbiol.* **16**:350-358.

28. **Price, C. T., T. Al-Quadani, M. Santic, I. Rosenshine, and Y. Abu Kwaik.** 2011. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* **334**:1553-1557.
29. **Price, C. T., A. M. Richards, J. E. Von Dwingelo, H. A. Samara, and Y. Abu Kwaik.** 2014. Amoeba host-*Legionella* synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution. *Environ Microbiol* **16**:350-358.
30. **Qin, A., and B. J. Mann.** 2006. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol* **Jul 31**:69.
31. **Raghunathan, A., S. Shin, and S. Daepler.** 2010. Systems approach to investigating host-pathogen interactions in infections with the biothreat agent *Francisella*. Constraints-based model of *Francisella tularensis*. *BMC Syst Biol* **4**:118.
32. **Ramond, E., G. Gesbert, M. Rigard, J. Dairou, M. Dupuis, I. Dubail, K. Meibom, T. Henry, M. Barel, and A. Charbit.** 2014. Glutamate utilization couples oxidative stress defense and the tricarboxylic acid cycle in *Francisella* phagosomal escape. *PLoS Pathog* **10**:e1003893.
33. **Santic, M., and Y. Abu Kwaik.** 2013. Nutritional virulence of *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:112.
34. **Santic, M., R. Asare, I. Skrobonja, S. Jones, and Y. Abu Kwaik.** 2008. Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun* **76**:2671-2677.



- 2 35. **Sauer, J. D.** 2006. Contribution of Pht Transporters to Nutrient Acquisition and  
3 Differentiation of Intracellular *Legionella pneumophila*. PhD thesis. University of  
4 Michigan, Ann Arbor, MI.
- 5 36. **Schulert GS, McCaffrey RL, Buchan BW, Lindemann SR, Hollenback C, Jones**  
6 **BD, and A. LA.** 2009. *Francisella tularensis* Genes Required for Inhibition of the  
7 Neutrophil Respiratory Burst and Intramacrophage Growth Identified by Random  
8 Transposon Mutagenesis of Strain LVS. *Infect. Immun.* **77**:1324-1336.
- 9 37. **Sjostedt, A. (ed.).** 2011. *Francisella tularensis* and tularemia. Fontiers Media SA.
- 10 38. **Sonenshein, A. L.** 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*.  
11 *Nat Rev Microbiol* **5**:917-927.
- 12 39. **Steeb, B., B. Claudi, N. A. Burton, P. Tien, A. Schmidt, H. Farhan, A. Maze,**  
13 **and D. Bumann.** 2013. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances  
14 *Salmonella* virulence. *PLoS Pathog* **9**:e1003301.
- 15 40. **Steele, S., J. Brunton, B. Ziehr, S. Taft-Benz, N. Moorman, and T. Kawula.** 2013.  
16 *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy  
17 to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathog* **9**:e1003562.
- 18 41. **Weiss, D. S., A. Brotcke, T. Henry, J. J. Margolis, K. Chan, and D. M. Monack.**  
19 2007. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella*  
20 virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6037-6042.

## Legends to Figures and Tables

### Figure 1. The transporter IleP

(A) The gene *ileP* (*FTN\_1654*) of *F. novicida* (U112) is flanked by two genes in opposite orientation (*FTN\_1653*, upstream; and *FTN\_1655*, downstream), separated by short intergenic regions (76 bp and 1 bp, respectively). This region is highly conserved in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (LVS) and *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (Schu) strains.

(B) The Protein IleP is predicted to comprise 12 transmembrane helices, with the N and C-terminal extremities facing the cytoplasm. Two-dimensional model of Ile folding was performed using the HMM<sup>TM</sup> program and TMRPres2D for visual representation.

### Figure 2. Growth in Chemically Defined Medium (CDM)

(A) Growth of wild-type *F. novicida*,  $\Delta ileP$  and  $\Delta ileP$  complemented strains was assayed in the optimized CDM medium for *F. novicida* described in (12). This medium contains eleven amino acids: arginine, lysine, histidine, tyrosine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, aspartic acid, serine, proline.

WT, wild-type *F. novicida*; WT pKK(-), WT carrying pKK214;  $\Delta ileP$ , WT deleted from gene *ileP*;  $\Delta ileP$  pKK(-),  $\Delta ileP$  strain carrying pKK214;  $\Delta ileP$ -comp,  $\Delta ileP$  carrying pKK214-*pgro-ileP*.

(B) CDM<sub>min</sub> supplemented with casamino acids (0.5% final); (C) CDM<sub>min</sub> supplemented -or not- with an equimolar mixture (3 mM final) of non essential amino acids (threonine, valine, alanine, glutamate, glutamine, glycine, phenylalanine, tryptophane and asparagine); (D)

CDM<sub>min</sub> supplemented -or not- with threonine (Thr, 3 mM final); (E) CDM<sub>min</sub> supplemented - or not- with decreasing concentrations of threonine (from 0.2 mM to 20 mM final); (F) Wild-type *F. novicida* was grown in CDM<sub>min</sub> (WT), or CDM<sub>min</sub> lacking isoleucine, supplemented (WT -Ile+Thr) or not (WT -Ile) with threonine (3 mM final).

### Figure 3. Transport assays

Kinetics of uptake of <sup>14</sup>C radiolabeled isoleucine (A) or leucine (B) by wild-type *F. novicida* (WT) and  $\Delta ileP$  mutant, at substrate concentrations ranging from 1 to 100  $\mu$ M.

### Figure 4. Impact of $\Delta ileP$ inactivation on *F. novicida* virulence

(A, B) **Intracellular multiplication** of the  $\Delta ileP$  mutant in J774.1 murine macrophage-like cells was essentially identical to that of wild-type *F. novicida* (WT) in standard DMEM (A). Under limiting concentrations of threonine (using modified DMEM, containing decreasing concentrations of threonine), multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant was significantly impaired as compared to wild-type (from 8  $\mu$ M and lower concentrations of threonine) (B). Intracellular replication was monitored, after 24 hours of infection, by enumerating colony-forming units (cfu) on chocolate agar plates. Each experiment was performed in triplicate. \*\*,  $P < 0.01$  (as determined by student's *t* test).

(C, D) **Confocal microscopy**. J774.1 cells were incubated for 1 h with wild-type *F. novicida* or  $\Delta ileP$  mutant strain and their co-localization with the phagosomal marker LAMP1 was observed by confocal microscopy. The phagosomes of J774.1 cells were labeled with anti-LAMP1 antibody (1/100 final dilution). Cell nuclei were labeled with DAPI. Bacteria (white triangles) were labeled with primary mouse monoclonal antibody anti-*F. novicida* (1/500

final dilution). (C) The color images represent wild-type *F. novicida* (WT) and  $\Delta ileP$ , bacteria (green); phagosomes (red); and nuclei (blue). (D) Quantification of bacteria/phagosome co-localization at 1 h, 4 h and 10 h for WT,  $\Delta ileP$  and  $\Delta FPI$  strains. \*\*,  $P < 0.01$  (as determined by student's *t* test).

(E) **In vivo dissemination.** Groups of five female BALB/c mice were infected intraperitoneally (ip) with either wild-type *F. novicida* (WT, black diamonds) or  $\Delta ileP$  mutant strain (black squares) (200 CFU per mouse). The data represent the number of bacteria per organ (S, spleen; L, Liver) for each mouse, 72 h after infection. Results are shown as log<sub>10</sub> CFU per organ  $\pm$  standard deviations.\*\*,  $P < 0.01$  (as determined by student's *t* test).

### **Figure 5. IleP of LVS (FTL\_1803) is required for growth under isoleucine limiting conditions**

(A) **In broth.** In standard CDM (containing 1.5 mM Ile; 5), growth of the  $\Delta ileP$  mutant ( $\Delta FTL_{1803}$ ) was slightly affected. When the concentration of Ile was reduced to 0.15 mM, multiplication of wild-type LVS was essentially not affected whereas that of the mutant was almost totally abolished.

#### **(B, C, D) In cells.**

(B) Intracellular multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant strain ( $\Delta FTL_{1803}$ ) was monitored in J774.1 macrophages after 24 h of infection and compared to wild-type LVS, in DMEM containing decreasing concentrations of Ile. The 80  $\mu$ M Ile concentration (boxed) was chosen for further analyses.

(C, D) Intracellular multiplication of the  $\Delta ileP$  mutant strain ( $\Delta FTL_{1803}$ ) was monitored in DMEM supplemented with 80  $\mu$ M Ile, in J774.1 (C), and THP-1 (D) macrophages, and compared to wild-type LVS.

(E, F) J774.1 cells were incubated for 1 h with wild-type LVS or the  $\Delta ileP$  mutant strain ( $\Delta FTL_{1803}$ ) and their co-localization with the phagosomal marker LAMP1 was observed by confocal microscopy. The phagosomes of J774.1 cells were labeled with anti-LAMP1 antibody (1/100 final dilution). Cell nuclei were labeled with DAPI. Bacteria (white triangles) were labeled with primary mouse monoclonal antibody anti-*Francisella* (1/500 final dilution). (E) The color images represent wild-type LVS (WT) and  $\Delta ileP$ , bacteria (green); phagosomes (red); and nuclei (blue). (F) Quantification of bacteria/phagosome co-localisation at 1 h, 4 h and 10 h for WT and  $\Delta ileP$  strains. \*\*,  $P < 0.01$  (as determined by student's *t* test).

## **Fig 6. Isoleucine uptake and the BCAA biosynthetic pathway in *Francisella* subspecies.**

### **(A) Schematic representation of isoleucine (Ile) entry.**

*F. novicida* (upper part) and *F. tularensis* LVS (lower part). Isoleucine crosses the bacterial cytoplasmic membrane via the MFS transporter IleP. In *F. novicida*, when threonine is available in the medium, threonine enters the bacterium (via a dedicated transporter) and can serve as a precursor for the biosynthesis of branched-chain amino acids (BCAAs) such as isoleucine, leucine and valine. In contrast, in *F. tularensis* LVS, isoleucine can only be obtained from the uptake of external isoleucine sources (via IleP and possibly other non-specific permeases).

(B) Schematic representation of the *ilval* operon in *F. novicida* U112 (U112), *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 (Schu) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (LVS) strains. The intact *ilval* genes are colored in blue; the inactivated genes in LVS and Schu S4 genomes, in pink; the flanking genes (*eng* and *mfd*), in grey.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Figure S1. Multiple alignment of IleP-like proteins.** Alignments were performed using the CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments program. The *F. novicida* IleP protein (Ftn, FTN\_1654) was compared to its orthologues in *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (Ftm, FTM\_0120), *F. tularensis* subsp. *holarctica* virulent strain FSC200 (Fti, FTS\_1759), *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (Ftl, FTL\_1803), *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Ftt, FTT\_0056c), and PhtJ of *L. longbeach* (llo, LLO\_3121). The six predicted external loops (see **Fig 1A**) are in red (E1 to E6). The large central internal loop (I3) is in blue. Of note, the LLO\_3121 protein bears a large deletion (13 residues long) in its predicted largest and most distal periplasmic loops.

**Figure S2. qRT-PCR analysis of the *ileP* region.** The expression of *ileP* (FTN\_1654) and its flanking genes *FTN\_1653*, *FTN\_1655* was monitored by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR), in wild-type *F. novicida* (WT) or  $\Delta$ *ileP* mutant grown in Schaedler-K3 broth at 37°C. Assays were performed twice using independent samples (in triplicate).

**Figure S3. The BCAA biosynthetic pathway.** *F. novicida* possesses all the genes for the biosynthesis of isoleucine (Ile), valine (Val) and leucine (Leu), from threonine (Thre). Grey arrows symbolize the predicted enzymatic reactions. The first gene of the *ilvAL* operon encodes a putative protein sharing 29.8% identity with the threonine dehydratase IlvA of *E. coli* K12 (converting threonine to 2-oxobutanoate or 2-ketobutyric acid); the *ilvB* and *ilvN* genes encode the large and small subunits of a putative acetolactate synthase (converting 2-oxobutanoate to 2-acetohydroxybutanoate); *ilvC*, encodes a putative acetohydroxy acid isomeroreductase (converting 2-acetohydroxybutanoate to R-3-hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate and converting 2-acetolactate to R-3-hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate); *ilvD* encodes a putative dihydroxyacid dehydratase (converting R-3-hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate to 3-methyl-2-oxopentanoate and converting R-3-hydroxy-3-methyl-2-oxobutanoate to 2-oxoisovalerate). The genome of *F. novicida* also contains an intact *ilvE* gene, encoding a putative multifunctional BCAA transferase, carrying out the final step in BCAA biosynthesis.

**Figure S4. Growth in Chemically Defined Medium (CDM).** Growth of wild-type *F. novicida* (WT) and  $\Delta ileP$  mutant strains was assayed in the optimized CDM medium for *F. novicida* (CDM<sub>min</sub>). (A) CDM<sub>min</sub> or CDM<sub>min</sub> without isoleucine (-Ile); (B) CDM<sub>min</sub> or CDM<sub>min</sub> without leucine (-Leu).

**Figure S5.** Multiplication of wild-type *F. novicida* (WT),  $\Delta ileP$  and complemented strains, in Hep G2 cells in standard DMEM. Intracellular multiplication of the *F. novicida*  $\Delta ileP$  mutant was moderately affected in Hep G2 cells. Constitutive expression of the wild-type

gene *ileP* (carried on pKK-*pgro-ileP*) restored normal intracellular replication. \*\*, P < 0.01 (as determined by student's *t* test).

WT, wild-type *F. novicida*; WT pKK(-), WT carrying pKK214;  $\Delta ileP$ , WT deleted from gene *ileP*;  $\Delta ileP$  pKK(-),  $\Delta ileP$  strain carrying pKK214;  $\Delta ileP$ -comp,  $\Delta ileP$  carrying pKK214-*pgro-ileP*.

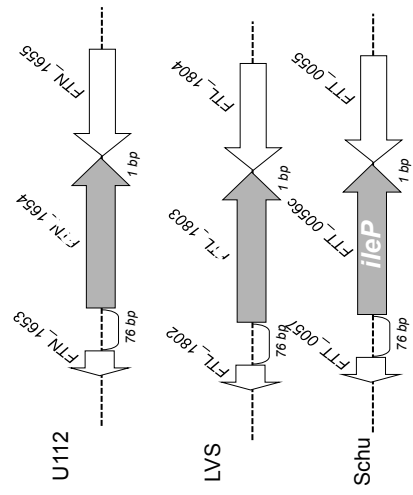
**Figure S6. Metabolic analyses of amino acid pools in LVS-infected THP-1 macrophages.** The concentration of intracellular isoleucine (Ile), leucine (Leu) and valine (Val) was quantified in THP-1 macrophages infected either with wild-type LVS or with a  $\Delta glC$  mutant (after 1 h and 24 h of infection) and compared to in uninfected THP-1 cells. Values are represented as a fold of the value recorded in uninfected cells.

**Table S1. Strains, plasmids and primers list.**

**Table S2. Amino acid content in *F. novicida* proteins**



A



B

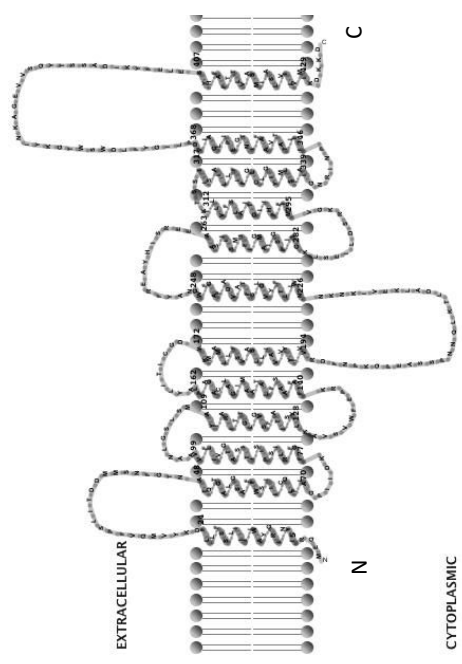


Figure 1

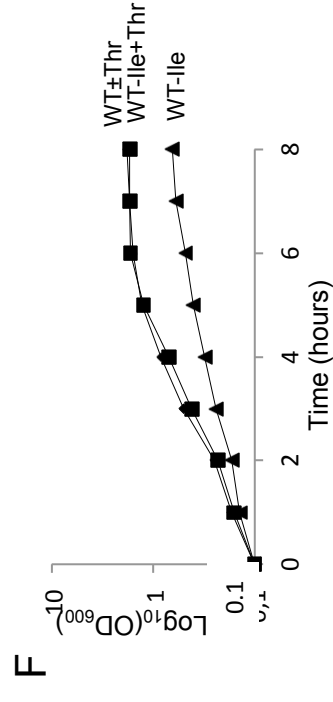
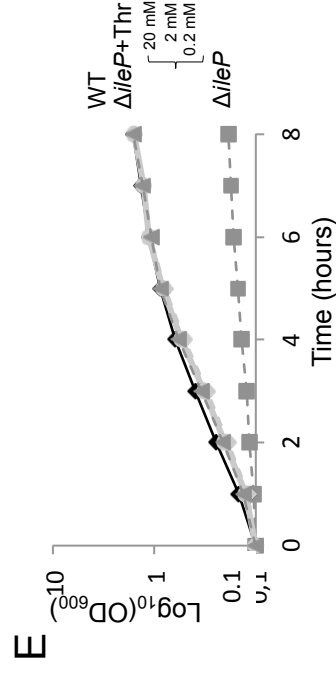
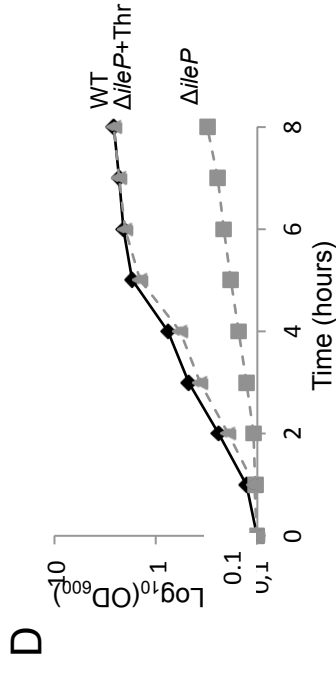
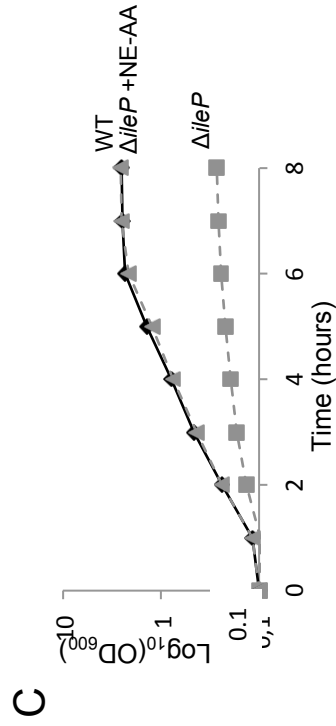
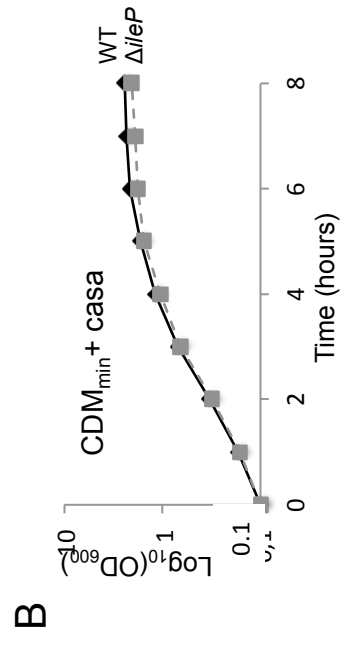
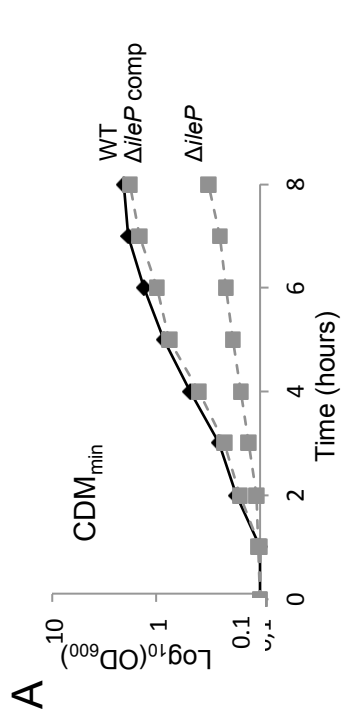


Figure 2

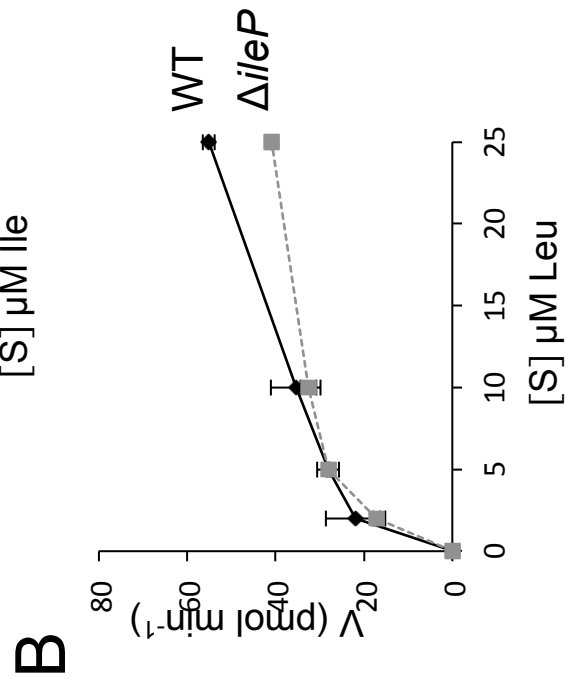
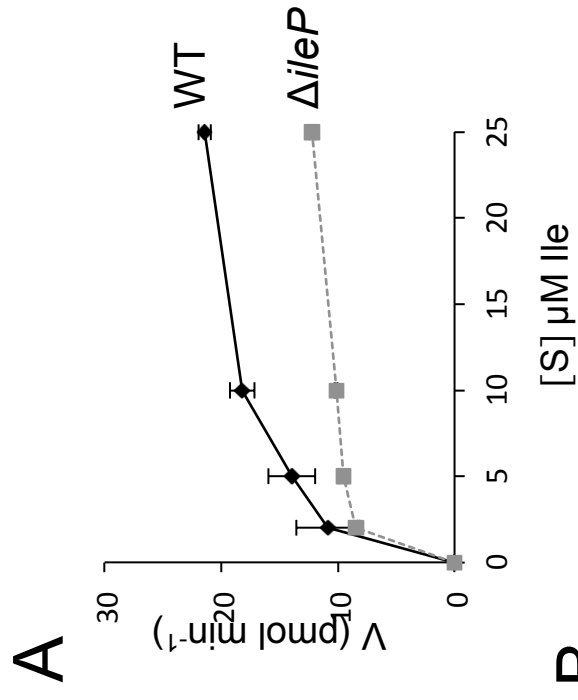


Figure 3

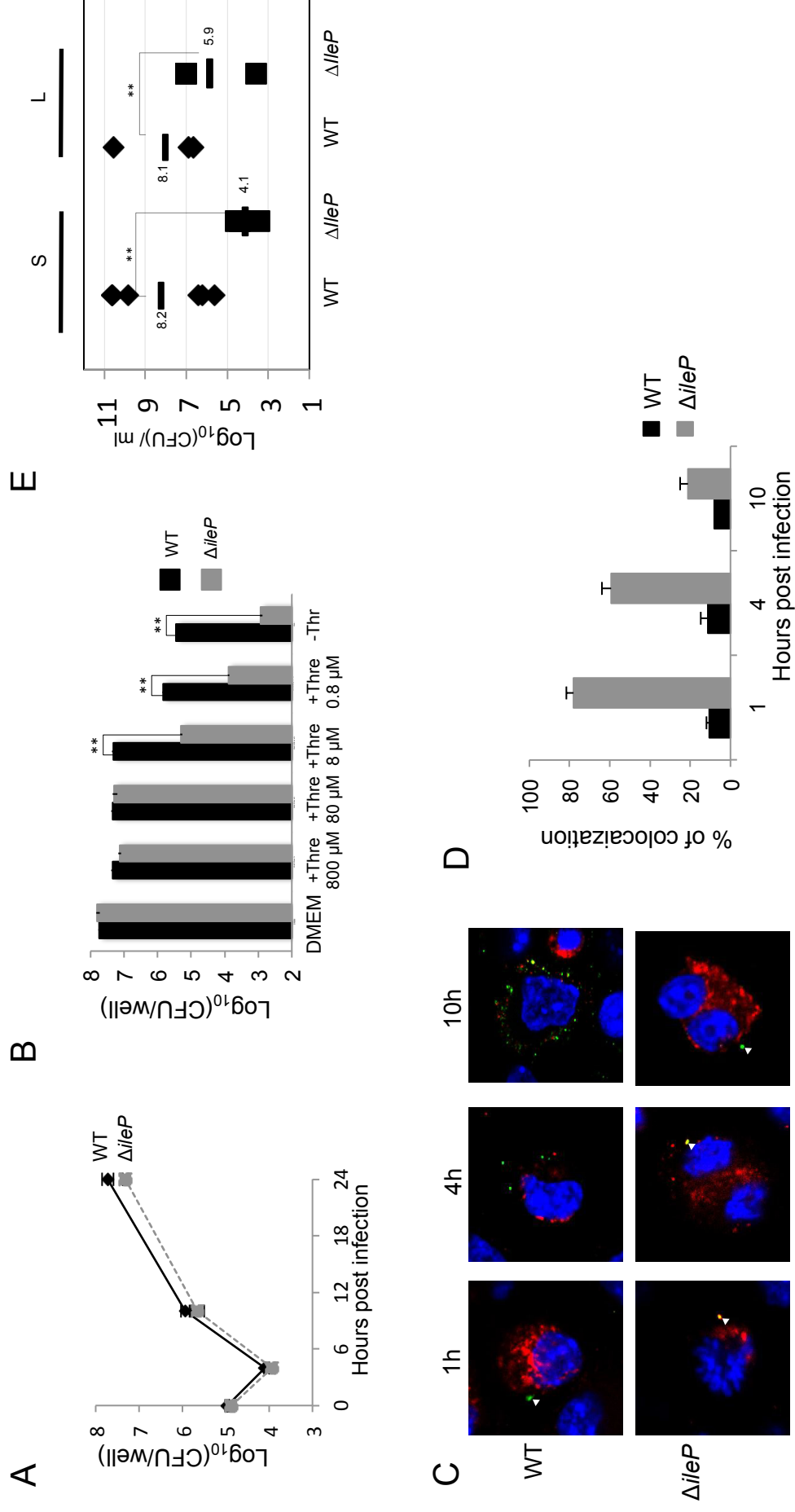


Figure 4

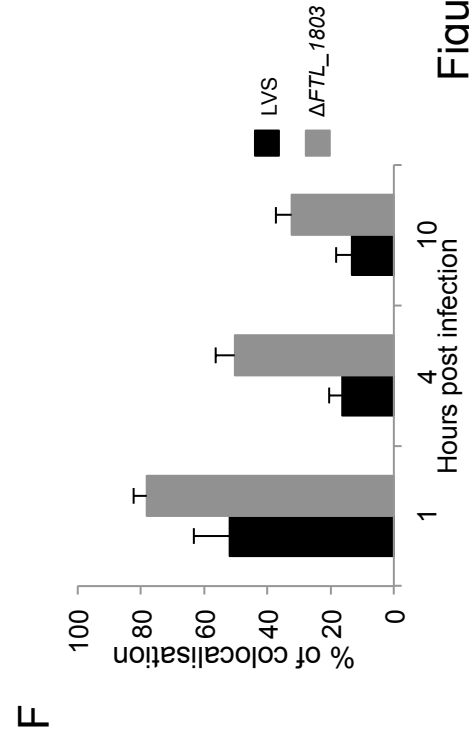
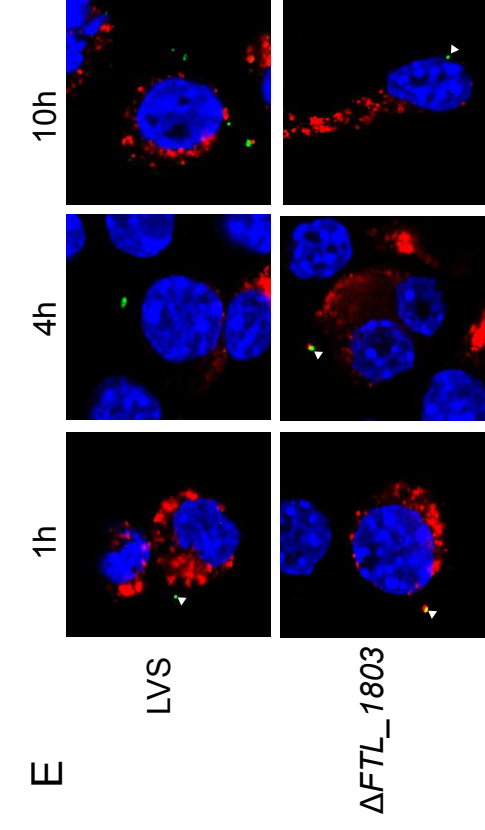
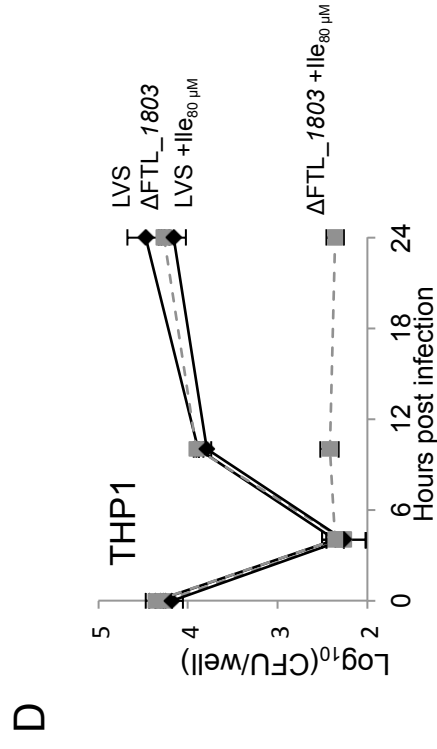
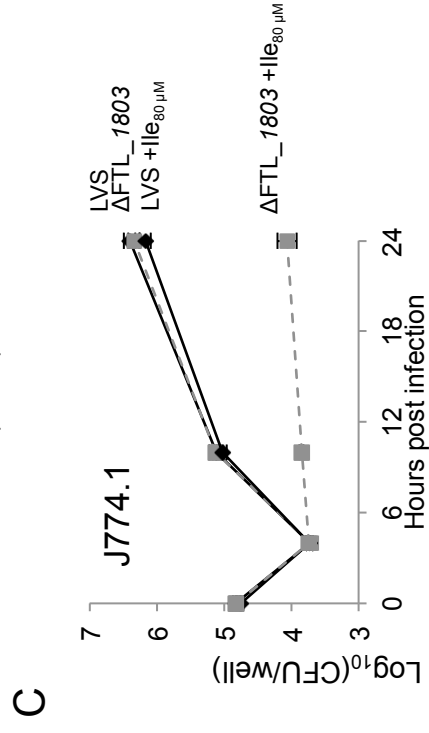
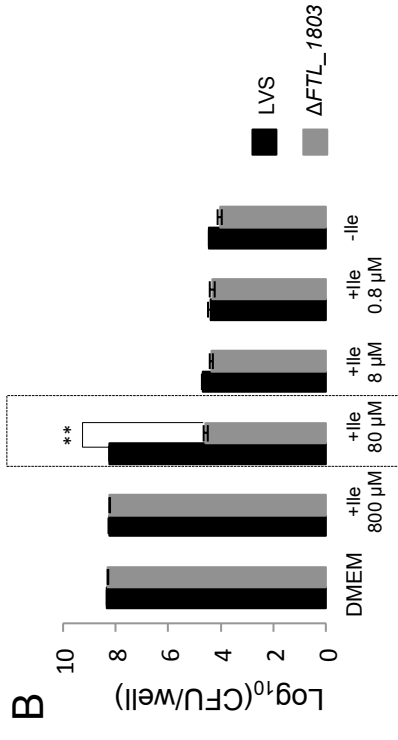
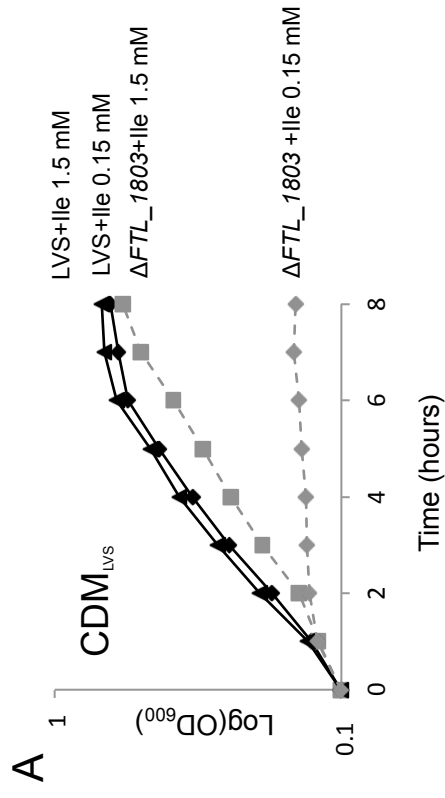


Figure 5



Figure 6

[illegible]

# Figure S1

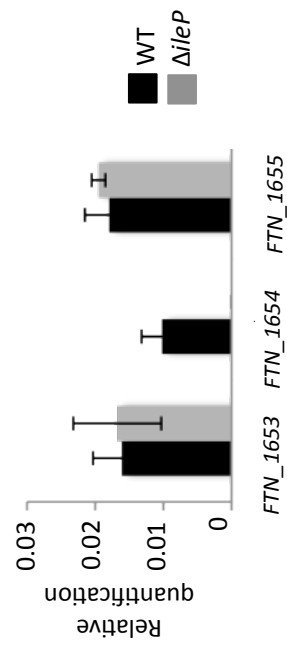


Figure S2



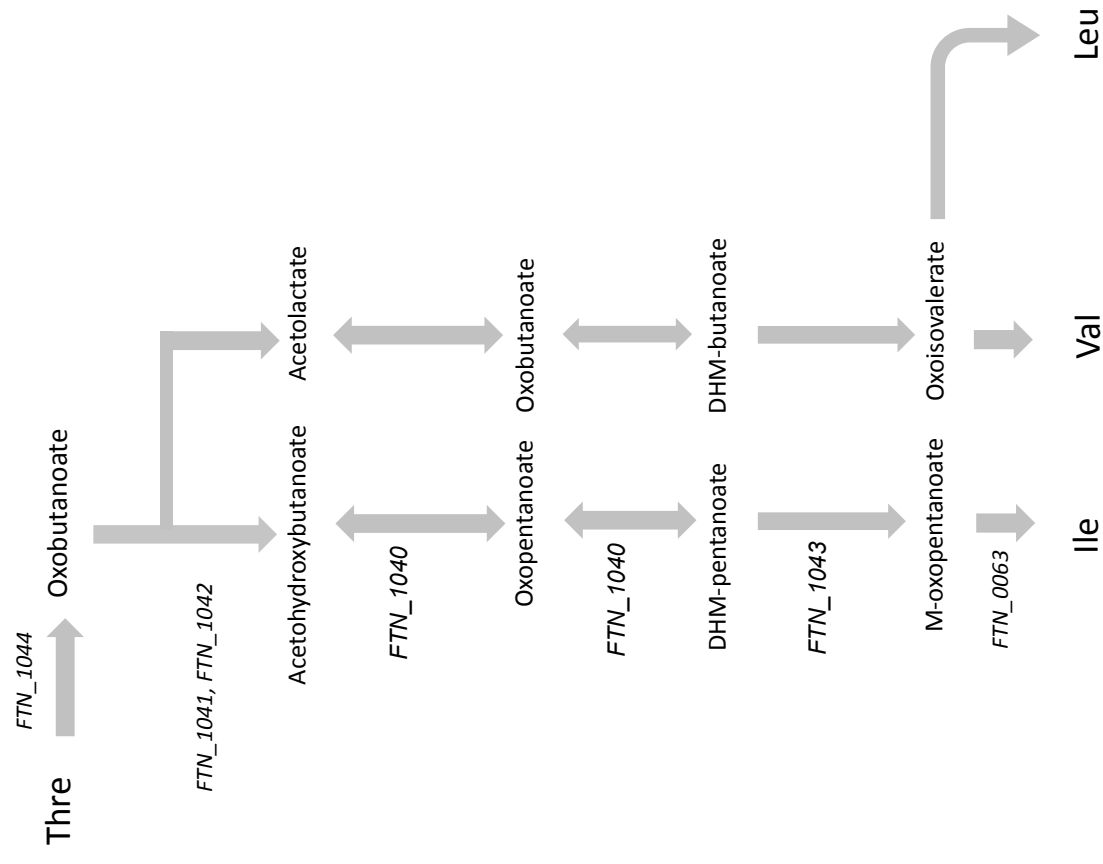


Figure S3

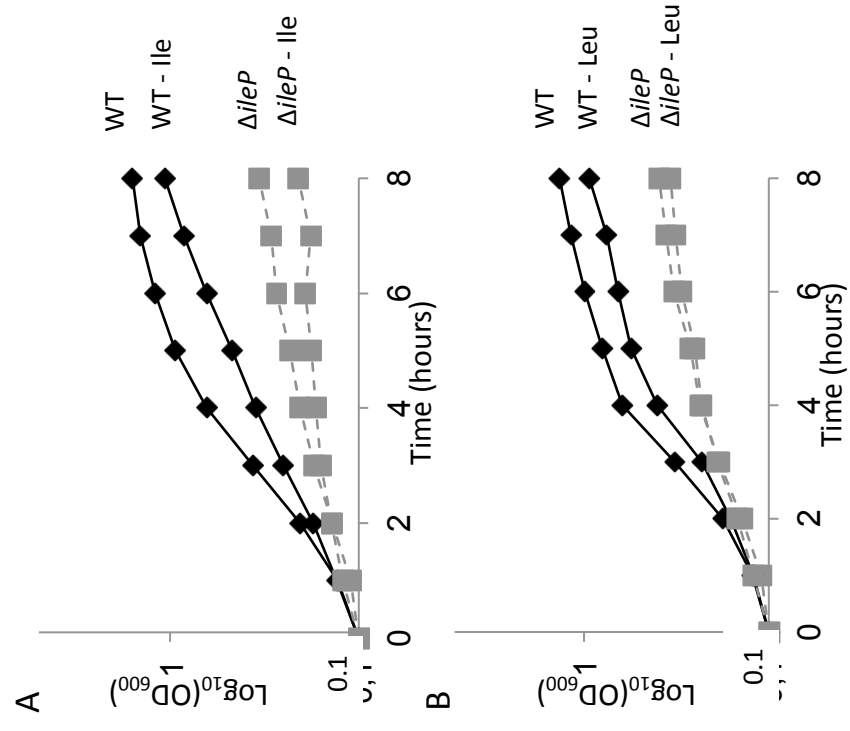


Figure S4

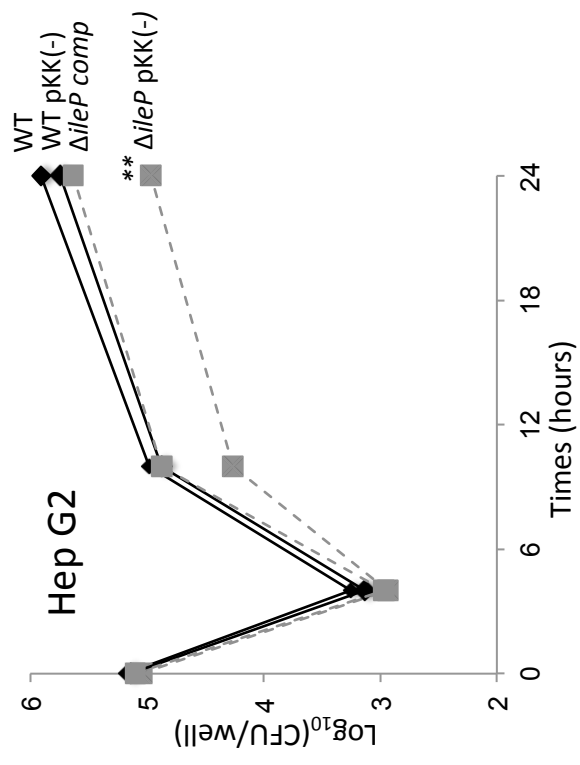


Figure S5

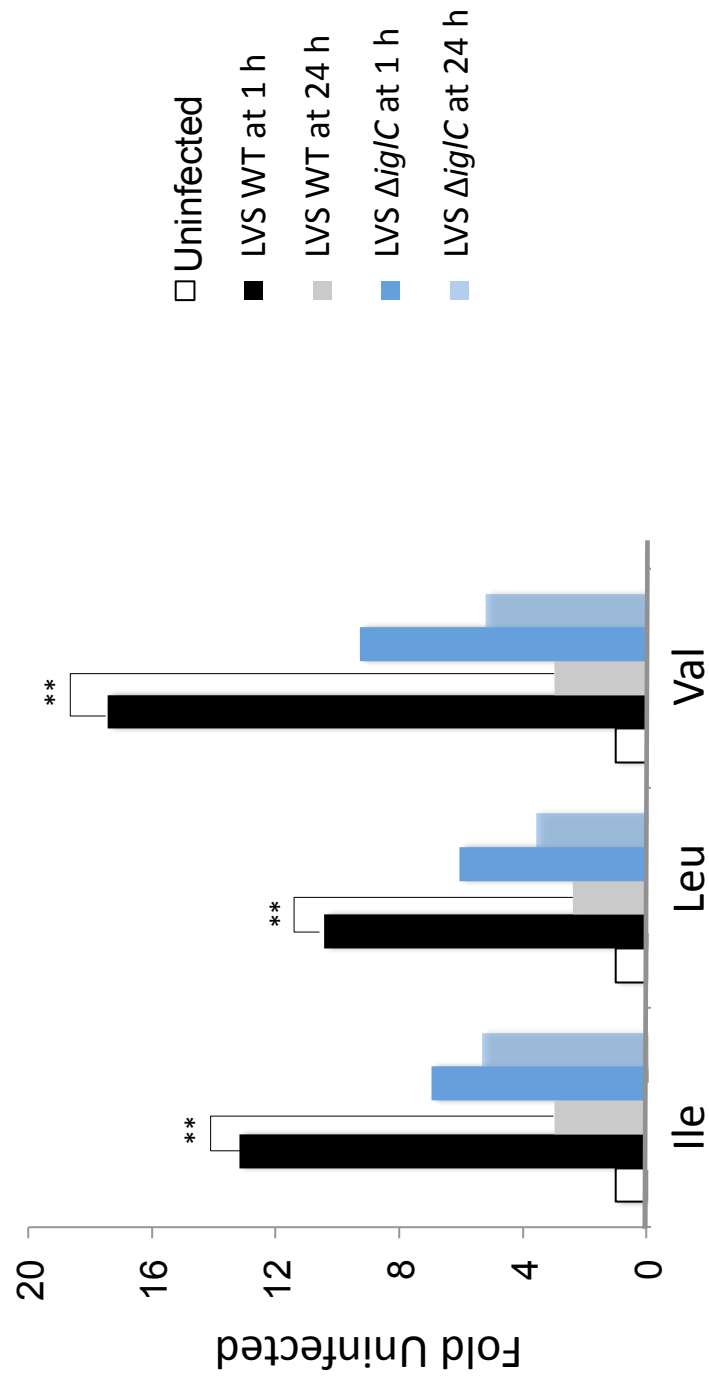


Figure S6

Strains, plasmids, primers	Description or sequence (5' _ 3')	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> K12	<i>TOP 10</i>	Invitrogen
U112	<i>F. tularensis</i> ssp <i>novicida</i> U112	A. Sjöstedt
U112Δ <i>FPI</i>	Chromosomal deletion of <i>the entire Francisella pathogenicity island (FPI)</i>	Weiss <i>et al.</i> (2007)
U112Δ <i>ileP</i>	Chromosomal deletion of <i>FTN_1654</i>	This work
U112 Δ <i>ileP</i> / pKK214- <i>FTN_1654</i>	U112 Δ <i>ile</i> containing complementing plasmid pKK214- <i>FTN_1654</i>	This work
LVS	<i>F. tularensis</i> ssp <i>holarctica</i> strain LVS	A. Sjöstedt
LVSΔ <i>FTL_1803</i>	Chromosomal deletion of <i>FTL_1803</i>	This work
LVS Δ <i>FTL_1803</i> / pKK214- <i>FTL_1803</i>	LVSΔ <i>FTN_1645</i> containing complementing plasmid pKK214- <i>FTL_1803</i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pMP812	<i>sacB</i> suicide vector, Kan <sup>R</sup>	LoVullo <i>et al.</i> (2009)
pMP812- <i>FTN_1654</i> up/down	pMP812 containing the indel; Kan <sup>R</sup>	This work
pKK214	Tet <sup>R</sup>	Kuoppa <i>et al.</i> (2001)
pKK214- <i>FTN_1654</i>	pKK214 containing the gene <i>FTN_1654</i>	

Oligonucleotide	number	Sequence (5' to 3' direction)
5' <i>FTN1654_upstreamF</i> -BamHI	p1	GCAAGGATCCGCAAAAGTAACATTAGGATCAGCAGTAGG
5' <i>FTN1654_upstreamR</i>	p2	CCGACTTATAGTCCGTTGAAACTCAAATTTAAGCGGCCGCTTTAA
5' <i>FTN1654_downstreamF</i>	p3	ATGGAACAAAGGATATACAATATACGTGGCGCATGATTGCTTCTCTT GTAATATTAGTAATG
3' <i>FTN1654_downstreamR</i> -notI	p4	TTAAAGCGGCCGCTTAAATTTGAGTTTCAACGGACTATAAGTCGG
5' <i>FTN_1654</i> amont	p5	CCTATTGCTGTTCTTAAAGCTGG
5' <i>FTN_1654</i> aval	p6	CAACGCGAATTATTTTACCTGC
5' <i>pgro_upstream</i> -SmaI	p7	TGCACCCGGGCGACGAACATACTCTATCTTG
3' <i>pgro_downstream</i>	p8	GCCACGTATATTGTATATCCTTTGTTCCATTTGTATGGATTAGTCGAG CTAAAAAGCTCAT
5' <i>FTN1654_pgro-upstream</i>	p9	ATGAGCTTTTGTAGCTCGACTAATCCATACAAATGGAACAAAGGATAT ACAATATACGTGGC
3' <i>FTN1654_downstream</i> -PstI	p10	CACGCTGCAGCACGATTTGAGAAATTTATCCAAGAG
5' <i>FTL_1803</i> upF	p11	CCAAAAAAGCCCATTATTAGCAAAG
3' <i>FTL_1803</i> downR	p12	GCGGATTTGAGAAATTTATCCAAGAG
5'race GSP1_ <i>FTN_1654</i>	p13	CAAACCTGGAGCTTTAGGTTTCAGC
5'race GSP2_ <i>FTN_1654</i>	p14	CACAAGGCACCAATCATTGCTG
5'race GSP1_ <i>FTN_1653</i>	p15	CTATCTGACCCTTTTGAACAAGATAGG
5'race GSP2_ <i>FTN_1653</i>	p16	CTGCAATTGATCTAAGCATTAGTTGG
5'race GSP1_ <i>FTN_1655</i>	p17	CTCTTGGATAAATTTCTCAAATCGTG
5'race GSP2_ <i>FTN_1655</i>	P18	AACTGAACTAAAGATGGCCAACG

**Table S1. Strains, plasmids and primers list.**

Amino acid	%	Amino acid	%
Asparagine	5.9	Glycine	5.7
Arginine	3.3	Histidine	1.8
<b>Isoleucine</b>	<b>9.4</b>	Lysine	8.2
<b>Leucine</b>	<b>9.7</b>	Methionine	2.4
Valine	6.3	Phenylalanine	4.9
Alanine	6.9	Proline	3
Asparatate	5.5	Serine	6.6
Cysteine	1.2	Threonine	5.1
Glutamine	3.8	Tryptophane	0.9
Glutamate	5.4	Tyrosine	4

**Table S2. Amino acid content in *F. novicida* proteins**

## **Discussion**

Mon projet de thèse a été centré sur l'importance d'une sous-famille de transporteurs MSF, appelée Pht, dans la virulence de *F. tularensis*. Deux transporteurs, AnsP et IleP, assurant respectivement le transport de l'asparagine et de l'isoleucine, ont été particulièrement étudiés.

Pour survivre et se multiplier, les bactéries intracellulaires doivent non seulement échapper au système immunitaire (Jones et al., 2012) mais aussi être en mesure d'adapter leur nutrition aussi bien du point de vue transport de nutriment que voies métaboliques, aux conditions nutritionnelles du compartiment dans lequel elles se trouvent. Pour ces pathogènes, et notamment *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Listeria* et *Francisella*, l'adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte est passée par une réduction de la taille du génome, les spécialisant ainsi à une niche donnée (Bliska and Casadevall, 2008). Cette réduction de la taille du génome entraîne notamment la perte de voies de biosynthèse pour certains acides aminés présents dans le compartiment de multiplication, créant ainsi une synchronisation des auxotrophies entre la bactérie intracellulaire et la cellule hôte (Price et al., 2014). C'est le cas pour *Chlamydia*, qui est auxotrophe pour la plus grande partie des acides aminés, pour les purines, les pyrimidines et des cofacteurs (Omsland et al., 2014), ainsi que pour *L. pneumophila* (Price et al., 2014)(voir Chapitre III, 1.2.3).

Le cytoplasme eucaryote, initialement considéré comme riche en nutriment et favorable à la croissance bactérienne, est maintenant reconnu comme un milieu défavorable à la multiplication des pathogènes (Ray et al., 2009). En effet, les acides aminés, glucides et ions y sont peu présents sous leur forme libre, aisément utilisable par la bactérie. Les pathogènes intracellulaires ont donc du adapter leurs mécanismes de capture et d'utilisation des nutriments à ces contraintes.

Afin d'obtenir en quantité suffisante les nutriments nécessaires à leur croissance, certaines bactéries intracellulaires ont mis en place des stratégies permettant de moduler les pools intracytoplasmiques, notamment d'acides aminés, en détournant les mécanismes naturels de l'hôte. C'est le cas d'*Anaplasma*, un pathogène intracellulaire utilisant la voie de l'autophagie pour former une vacuole protectrice, qui détourne la voie de dégradation protéique du protéasome pour augmenter la concentration cytoplasmique en acides aminés libres (Niu et al., 2012; Price et al., 2011). C'est aussi le moyen utilisé par le pathogène phagosomal *L. pneumophila* qui, en injectant la protéine effectrice AnkB, est en mesure de faire dégrader des protéines de l'hôte par le protéasome et donc d'augmenter la concentration d'acides aminés dans sa vacuole de multiplication (Price et al., 2011; Al-Quadani et al., 2012). Pour ces deux pathogènes, le blocage des voies de l'autophagie et du protéasome de l'hôte lors de l'infection



entraîne une très forte baisse de leur multiplication intracellulaire, qui peut être abolie par un ajout en excès d'acides aminés (Niu et al., 2012; Price et al., 2011) (voir Chapitre III, 1.2.1).

Chez *F. tularensis*, trois mécanismes ont été d'ores et déjà identifiés pour pallier le manque d'acides aminés libres dans le cytosol. (1) Le premier est l'induction de la formation de structures multi-membranaires, par un processus ressemblant à l'autophagie, dans les macrophages (Checroun et al., 2006). L'hypothèse initiale évoquée pour rendre compte de ce phénomène était la formation d'une niche de survie de *Francisella*. Cependant, des études plus récentes ont mis en évidence l'importance d'un processus d'autophagie ne passant pas par la voie classique (ATG5) pour la croissance optimale de *F. tularensis* (Chong et al., 2012; Steele et al., 2013) (voir Chapitre III, 2.1.5). Un rôle dans la nutrition est mis en avant, car le défaut de croissance de la bactérie dans des cellules où l'autophagie est inhibée, peut être compensé par un ajout d'acides aminés ou de pyruvate. (2) Le second mécanisme est la régulation positive de l'importeur d'acides aminés SLC1A5 (impliqué dans l'import d'acides aminés neutres et en particulier du glutamate) et la régulation négative concomitante du transporteur SLC1A7 à la membrane cellulaire (impliqué dans l'export de glutamate) (Barel et al., 2012) (voir Chapitre III, 2.1.5). La régulation de ces deux transporteurs, assurant en temps normal l'équilibre du pool d'acides aminés intracellulaires, favorise l'entrée et donc l'augmentation de la concentration cytosolique en acides aminés libres. Ainsi, le milieu intracellulaire devient plus favorable à la multiplication de *Francisella*. (3) Le dernier mécanisme mis en évidence est la capture, par *Francisella*, du glutathion, un tripeptide glutamate-cystéine-glutamine, comme source de cystéine, un acide aminé essentiel à la croissance bactérienne (Alkhuder et al., 2009). Cette capture suggère une évolution de la bactérie vers le transport d'un élément, abondant dans le cytosol, afin de compenser son auxotrophie pour la cystéine. Ces différents mécanismes, mis en place par *F. tularensis* lors de l'infection, reflètent l'importance de la nutrition dans la virulence de la bactérie, ainsi que la capacité de la bactérie à utiliser des processus de l'hôte et des nutriments abondants dans le cytoplasme pour subvenir à ses besoins.

Deux types de données de la littérature nous ont conduit à entreprendre l'étude des six transporteurs Pht de *Francisella* : i) l'identification du transporteur PhtA de la thréonine chez *L. pneumophila*, une bactérie phylogénétiquement proche de *Francisella*, (Sauer et al., 2005) et de son rôle dans la croissance intra-phagosomale et la différenciation de la bactérie ; ii) la

mise en évidence, par des analyses génomiques, de la présence de transporteurs de la sous-famille Pht dans différentes bactéries pathogènes à multiplication intracellulaire, dont *Francisella* (Chen et al., 2008). L'étude du phénotype de croissance en milieu minimum et de multiplication intra-macrophagique de mutants dans les gènes codants pour les six transporteurs Pht de *F. novicida*, nous a amené à caractériser plus finement les activités de transport de deux d'entre eux : FTN\_1586 ou AnsP et FTN\_1654 ou IleP.

L'impact du transporteur AnsP sur la virulence nutritionnelle de *F. novicida* a tout d'abord été étudié. Nous avons pu observer qu'une délétion du gène *ansP* conduit à une forte diminution de la multiplication intracellulaire de *F. tularensis*, réversible par ajout d'asparagine. L'asparagine est le seul acide aminé en mesure de restaurer la croissance de la bactérie, que ce soit dans sa forme libre ou sous la forme d'un dipeptide. Cet acide aminé est particulièrement intéressant. En effet, bien que non requis pour la croissance en milieu synthétique, il est nécessaire à la multiplication intracellulaire de *Francisella*. Un phénomène analogue est décrit chez *M. tuberculosis*. Cette bactérie, prototrophe en milieu de culture pour l'intégralité des vingt acides aminés, possède en effet deux transporteurs, l'un d'aspartate et l'autre d'asparagine, importants pour sa croissance intracellulaire (Gouzy et al., 2014). Ainsi, chez les pathogènes intracellulaires, le fait de posséder une voie de biosynthèse active ne permet pas de prédire l'absence d'un système de transport efficace, ni la nécessité de celui-ci pour la virulence. Ces résultats vont donc dans le sens du postulat indiquant une préférence de la capture face à la synthèse, quand le nutriment est présent dans le milieu extérieur. Cette favorisation du transport ne semble pas être uniquement le fait d'un gain d'énergie mais aussi d'une adaptation plus rapide aux différents changements de l'environnement nutritionnel. Dans le cas d'AnsP, cette adaptation nutritionnelle, via la capture d'asparagine, semble être en lien avec l'arrivée de la bactérie dans le cytoplasme.

La seconde partie de mon travail m'a amené à caractériser le transporteur IleP, que j'ai identifié comme un transporteur d'isoleucine, impliqué dans la virulence de *F. tularensis*. L'isoleucine, qui est classée dans les acides aminés ramifiés (en anglais « Branched-chain amino acids » ou BCAA) tout comme la leucine et la valine, fait partie des acides aminés utiles non essentiels pour la croissance de *F. tularensis* en milieu minimum. L'isoleucine étant nécessaire à la croissance optimale de *F. tularensis* subsp *novicida* en milieu synthétique, le mutant dans le gène *ileP* est donc atténué dans sa croissance en milieu minimum. Cette atténuation est réversible par l'ajout d'un autre acide aminé : la thréonine. La dépendance

d'un apport extérieur de thréonine pour un mutant dans le gène *ileP* est aussi observable dans le contexte de l'infection *in vitro* de macrophages murins J774. Cette complémentation du défaut de croissance et de multiplication par la thréonine chez *F. novicida* s'explique par la présence d'une voie de biosynthèse active des BCAA en partant de la thréonine. A l'inverse, cette voie est annotée comme inactive chez les sous-espèces plus virulentes *F. holarctica* et *F. tularensis*. Pour ces dernières sous-espèces, l'apport d'isoleucine, via le transporteur IleP, est donc absolument nécessaire à leur croissance. Cette observation illustre bien la spécialisation nutritionnelle des pathogènes à leur niche préférentielle. En effet, la sous-espèce *novicida*, principalement environnementale, est à la fois en mesure de capter l'isoleucine et de la synthétiser à partir de la thréonine. Cette diversité des possibilités nutritionnelles la rend donc plus adaptée à des changements de milieux, fréquents dans l'environnement. A l'inverse, les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*, plus virulentes, ont spécialisé leur nutrition aux acides aminés disponibles dans le cytoplasme de l'hôte et ont privilégié le transport de l'isoleucine à la biosynthèse. Ce mécanisme d'adaptation nutritionnelle, via une réduction du génome, a déjà été observé chez *S. typhi* (Holt et al., 2009; McClelland et al., 2001; Thomson et al., 2008) et peut aller jusqu'à la synchronisation des auxotrophies de la bactérie avec l'hôte, comme identifiés chez *L. pneumophila* (Price et al., 2014).

Ces travaux, qui ont permis la caractérisation des transporteurs d'asparagine et d'isoleucine AnsP et IleP, mettent bien en lumière le phénomène d'adaptation nutritionnelle que réalise *Francisella* en pénétrant dans le milieu intracellulaire. En effet, ces deux acides aminés, d'importance variable pour la croissance de la bactérie en milieu minimum (l'asparagine fait partie des acides aminés inutiles et l'isoleucine des utiles non essentiels), apparaissent comme essentiels lors de la multiplication intracellulaire. Nos travaux ont de plus montré que le rôle de ces transporteurs, non limité au compartiment phagosomal, est essentiel durant la totalité du cycle intracellulaire de *Francisella* et notamment lors de la multiplication cytosolique. Il pourrait donc être judicieux de renommer plus généralement cette sous-famille « Transporteurs d'Acides Aminés Intracellulaires ».

L'étude de la nutrition dans le cadre de l'infection rencontre deux difficultés principales : d'une part, la nature complexe du cytosol et la variation des pools de nutriments retrouvés en fonction des types cellulaires et du milieu de culture ; d'autre part, la variation de la capture et de l'utilisation des nutriments par la bactérie en fonction des environnements nutritionnels. De nouvelles approches, combinant des méthodes d'analyse de mutants classiques avec des

approches de métabolomiques *in vitro et in vivo*, devraient permettre d'en savoir plus sur l'acquisition des nutriments par les bactéries intracellulaires et sur leur métabolisme. De même, l'analyse des profils transcriptionnels ou protéomiques des bactéries, dans le cadre de l'infection *in vivo*, pourrait permettre d'identifier les gènes et protéines métaboliques essentiels à l'infection, en fonction du modèle animal utilisé, du type d'infection et de la voie d'inoculation. Pour terminer, l'utilisation de nutriments marqués par des radioisotopes devrait permettre de connaître les sources de carbone et d'azote captés par la bactérie lors de l'infection.

L'augmentation des connaissances concernant les stratégies d'exploitation des nutriments de l'hôte par les bactéries, devrait favoriser le développement de mutants d'auxotrophie utilisables pour la vaccination humaine et animale. De plus, en ciblant les voies de métabolisme importantes pour la nutrition de la bactérie ainsi que les mécanismes d'utilisation des nutriments de l'hôte, de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des infections sont possibles par réduction de l'accès aux nutriments.

## Annexes :

En parallèle de mes travaux sur les transporteurs Pht, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres projets du laboratoire. Un premier projet a porté sur l'étude d'un transporteur de glutamate, GadC, impliqué dans la résistance au stress oxydant rencontré par *Francisella* dans le compartiment phagosomal des macrophages infectés. Un second projet a porté sur l'étude d'une protéine chaperon, MoxR, impliquée dans plusieurs fonctions métaboliques majeures de la bactérie. Enfin, j'ai participé à la rédaction d'une revue portant sur les protéines impliquées dans la virulence et la réplication de *Francisella* à l'intérieur des macrophages. Les publications correspondantes sont présentées ci-après.

**Annexe 1 : Proteins involved in *Francisella tularensis*  
survival and replication inside macrophages.**

# Proteins involved in *Francisella tularensis* survival and replication inside macrophages

Elodie Ramond<sup>1,2†</sup>, Gael Gesbert<sup>1,2†</sup>, Monique Barel<sup>1,2</sup> & Alain Charbit<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75730, Paris, Cedex 15, France

<sup>2</sup>INSERM U1002, Unité de Pathogénie des Infections Systémiques, Paris, France

\*Author for correspondence: [alain.charbit@inserm.fr](mailto:alain.charbit@inserm.fr)

†Authors contributed equally

*Francisella tularensis*, the etiological agent of tularemia, is a member of the  $\gamma$ -proteobacteria class of Gram-negative bacteria. This highly virulent bacterium can infect a large range of mammalian species and has been recognized as a human pathogen for a century. *F. tularensis* is able to survive *in vitro* in a variety of cell types. *In vivo*, the bacterium replicates mainly in infected macrophages, using the cytoplasmic compartment as a replicative niche. To successfully adapt to this stressful environment, *F. tularensis* must simultaneously: produce and regulate the expression of a series of dedicated virulence factors; adapt its metabolic needs to the nutritional context of the host cytosol; and control the innate immune cytosolic surveillance pathways to avoid premature cell death. We will focus here on the secretion or release of bacterial proteins in the host, as well as on the envelope proteins, involved in bacterial survival inside macrophages.

*Francisella tularensis* is a small Gram-negative bacterium responsible for tularemia, a zoonotic disease that includes several clinical manifestations and various levels of severity depending on the route of entry of the bacteria [1]. The most common route of infection is through the skin, leading to ulceroglandular tularemia. Inhalation of the bacteria can lead to pneumonic tularemia, which is a life-threatening disease. In the absence of antibiotic treatment or if treatment is not taken early enough, mortality during pneumonic tularemia can be as high as 30% [2]. Furthermore, *F. tularensis* is one of the most highly infectious pathogens for humans. Indeed, the lethal dose for humans is estimated to be less than ten bacteria upon inhalation. In addition, *F. tularensis* is naturally resistant to penicillin due to the expression of  $\beta$ -lactamase. These features have led the CDC to classify *F. tularensis* as a category A bioterrorism agent [3].

Four different subspecies of *F. tularensis* that differ in virulence and geographic distribution exist, designated *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies, causing severe disease in humans, whereas *F. tularensis* subsp. *holarctica* causes a disease that is similar but less severe [4]. While subsp. *mediasiatica* may cause human disease, it is rare that subsp. *novicida* does so. However, *F. tularensis* subsp. *novicida*, which is still highly virulent for mice, is often used as a surrogate

model to study the molecular basis of *F. tularensis* pathogenesis [5]. *F. tularensis* is a facultative intracellular pathogen that infects a variety of cell types within the host, such as phagocytes (including neutrophils), epithelial cells and hepatocytes. Mutant strains that are unable to replicate inside phagocytic cells are generally severely attenuated for virulence, and the ability of the bacterium to enter and replicate inside macrophages is essential for the pathogenicity of *F. tularensis* [6].

*F. tularensis* replicates in the cytosolic compartment of infected cells. Until recently, the host cytosol was considered to be a safe and nutrient-replete haven for the few bacterial pathogens that have chosen this cellular compartment for survival and multiplication [7]. It is now clear that cytosolic bacteria have to face a highly stressful environment in which they must:

- Adapt their metabolism to the nutritional context of the host cytosol;
- Control the innate immune mechanisms, in particular the cytosolic surveillance pathways, to avoid premature cell death;
- Produce and regulate the optimal expression of dedicated virulence factors at the different steps of its infectious cycle.

The capacity of a macrophage to deprive intracellular pathogens of required nutrients [8] is now viewed as an intrinsic antimicrobial innate immune defense mechanism, often referred to

## Keywords

■ bacterial pathogen  
■ *Francisella tularensis*  
■ intracellular survival ■ protein secretion systems ■ virulence

as 'nutritional immunity' (e.g., see [9]). We have recently discussed the importance of metabolism and nutrition for *F. tularensis* pathogenesis [10], and so this aspect will not be discussed here. Cytosolic surveillance systems, which exist to monitor the presence of microbial molecules within the host cytosol and mount antibacterial responses, include capturing by autophagy [11,12] and triggering cell death pathways, including apoptosis and pyroptosis. *F. tularensis* largely escapes autophagy [13], delays cytosolic innate immune responses [14] and is able to perform approximately seven to eight replication cycles in the host cytosol [15]. The mechanisms and attributes used by *F. tularensis* to avoid/manipulate host surveillance pathways have been recently reviewed elsewhere (for reviews, see [16–18]).

In this review, we aim to provide a comprehensive update of the proteins involved in *F. tularensis* replication inside macrophages. Special attention will be paid to the mechanisms involved in the secretion and/or release of proteins in the host cell.

### Secreted proteins

In bacteria, secreted proteins cross the cytoplasmic membrane either via the general secretory pathway (or Sec translocon, for the secretion of unfolded proteins) or the twin arginine translocation pathway (Tat, for the secretion of folded proteins). These two pathways, dedicated to the secretion of proteins bearing typical N-terminal signal sequences [19], are present in all domains of life. In addition, bacteria possess more dedicated protein secretion systems and appendages to secrete molecules in the external milieu. In Gram-negative bacteria, eight different protein secretion pathways have been described thus far, designated type I (T1SS) to type VIII (T8SS) secretion systems [20–23]. Some of these systems (T3SS, T4SS and T6SS, in particular) have been implicated in interactions between bacterial and eukaryotic cells and in the translocation of bacterial effectors directly into the eukaryotic cytosol [24].

*In silico* analysis of *Francisella* genomes reveals, in addition to the classical components of the general Sec pathway, the presence of at least three specific secretion machineries:

- A putative T1SS, including the channel-forming protein TolC;
- A type II-like secretion system, represented by type IV pili (or Tfp);
- A type VI-like secretion system, encoded by the *Francisella* pathogenicity island (FPI) (FIGURE 1).

By contrast, there is currently no evidence of the presence of intact T3SS or T4SS in *Francisella* [25,26]. Although several putative substrates of a Tat pathway can be predicted, it is noteworthy that no evidence of a functional Tat system has been provided.

The contribution of the T1SS, T2SS-like and T6SS in *F. tularensis* intracellular survival will be discussed below.

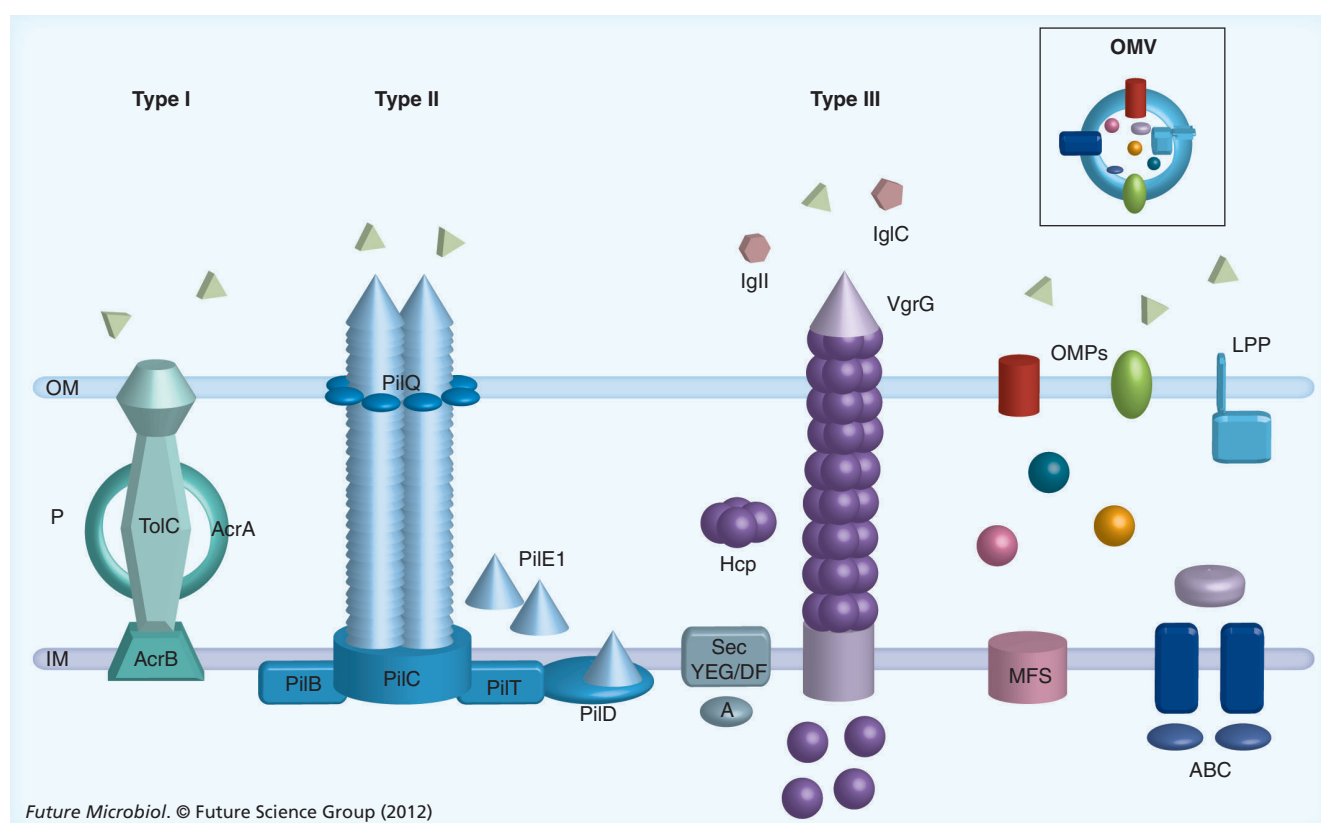
### Type I secretion

T1SS functions in the secretion of a variety of toxins and other virulence factors directly from the cytoplasm to the extracellular milieu in a single energized step. In *Escherichia coli*, the TolC protein is the outer membrane (OM) channel component of the T1SS involved in hemolysin secretion (via the HlyBD–TolC complex [27]) and in the efflux of small noxious molecules (via the AcrAB–TolC complex [28]). *F. tularensis* contains three TolC paralogs: TolC, FtlC and SilC [29]. Both TolC and FtlC participate in multidrug resistance in *F. tularensis*, but only TolC is a critical virulence factor in *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain LVS [30]. Moreover, a  $\Delta$ tolC mutant is hypercytotoxic to both murine and human macrophages, and elicits increased secretion of proinflammatory chemokines from human macrophages and endothelial cells. Hence, *F. tularensis* TolC is assumed to contribute to inhibition of host cell death and delaying host innate immune responses. Inhibition of host cell death is generally considered to be a strategy used by intracellular pathogens to prolong their survival and replication time in their intracellular niche. Remarkably, the targeted deletion of the *tolC* gene in *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain SCHU S4 resulted in significantly prolonged time to death [31], suggesting a similar role in both subspecies. The exact mechanism by which TolC participates to these processes is not known. One can speculate that, since TolC is located in the bacterial OM, it may interact directly with host cell components. Alternatively, TolC may constitute a genuine T1SS that delivers effector(s) (toxins or other molecules) that are responsible for the control of the host innate immune response.

### Type II secretion & type IV pili

The T2SS, also known as the main terminal branch of the general secretory (Sec) pathway, mediates the translocation of proteins from the periplasm across the OM of Gram-negative bacteria. The best-characterized T2SS is the pullulanase secretion apparatus of *Klebsiella* species,





**Figure 1. The secretion systems of *Francisella tularensis*.** From left to right: the type I secretion system (Tfp); the type II-like secretion system (Tfp); the general secretory apparatus (Sec); the type VI-like secretion system (*Francisella* pathogenicity island-encoded); and MFS and ABC transporters (IM), as well as OMPs and LPPs (OM). Inset depicts an OMV.

IM: Inner membrane; LPP: Lipoprotein; MFS: Major facilitator superfamily; OM: Outer membrane; OMP: Outer membrane protein; OMV: Outer membrane vesicle; P: Periplasm.

which is composed of 15 components, several of which are similar to Tfp proteins [32]. Tfp are multifunctional filamentous appendages that are involved in the virulence of many Gram-negative pathogenic bacteria, generally by promoting attachment to host cells [33]. Tfp and T2SS use homologous components to mediate substrate release [32]. However, in spite of their common origin, these systems have diverged and acquired unique properties to perform distinct biological functions.

The different subspecies of *F. tularensis* have different secretion capacities in broth [21,22]. Indeed, significant protein secretion in the extracellular medium has only been observed with *F. tularensis* subsp. *novicida* and is specifically mediated by Tfp. *F. tularensis* genomes contain numerous genes with similarity to known Tfp genes, including secretin (PilQ) and six genes predicted to encode major type IV pilin subunits, designated *pilE1* (or *pilA*) to *pilE6*. Surface fiber expression has been observed in both *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 and in *F. tularensis* subsp.

*novicida* U112 [34–36]. There is strong evidence in U112 and SCHU S4 strains that *pilE4* encodes the pilin subunit [35,36]. However, LVS completely lacks *pilE1* (*pilA*), has mutations in *pilE2* and *pilE3* (implying that the remaining functional pilin genes contribute to surface fiber expression) and expresses a nonfunctional PilT (the ATPase involved in pilus retraction).

At present, the role that Tfp-mediated secretion could play in *F. tularensis* virulence is still not fully understood. The very low level of protein secretion in pathogenic *F. tularensis* subsp. *holarctica* during growth in broth has been mainly attributed to the presence of pseudogenes of Tfp-encoding genes. However, in pathogenic *F. tularensis* subsp. *tularensis* species, the Tfp-encoding genes are intact, yet the bacterium secretes very low amounts of protein in the external milieu during growth in broth.

Of note, a recent proteomic analysis revealed the presence of low amounts of more than 100 proteins in cell culture filtrates of *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 and *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS [37]. Many of these proteins are not

predicted to be secreted, suggesting alternative secretion mechanisms in these bacteria.

The Tfp biogenesis genes *pilC* and *pilQ* both contribute to virulence in the highly virulent type A strain SCHU S4 [38]. The pilin Pile1 (PilA) is the only pilin that has been shown to be required for full virulence in both type A and type B strains [38,39]. However, the molecular mechanism whereby Pile1 promotes infection is not known. One might speculate that pilin subunits may constitute, or be part of, a type II-like secretion system required during intracellular growth to promote secretion of yet to be identified effectors.

#### Type VI secretion

The T6SS was first discovered in *Vibrio cholerae* and has now been identified in more than a quarter of all sequenced bacterial genomes [40]. Pathogenic bacteria use T6SS to inject effector proteins into infected host cells. In spite of a heterogeneous overall genetic organization, most T6SS systems encode homologs of *V. cholerae* proteins: IcmF (TssM), IcmH/DotU (TssL), ClpV, VipA (TssB), VipB (TssC), VgrG (TssI) and Hcp (TssD) proteins [41–43]. VgrG and Hcp are the two main proteins secreted by T6SS. They show structural resemblance to proteins of the cell-puncturing apparatus used by the T4 bacteriophage. Hence, Hcp may form a tubule-like hollow structure with a trimeric membrane-puncturing VgrG complex situated at the tip, through which macromolecules may be delivered directly into target cells [44]. In addition to Hcp and VgrG proteins, RbsB in *Rhizobium leguminosarum*, Evp in *Edwardsiella tarda* and TssM in *Burkholderia pseudomallei* have been identified as secreted T6SS effectors [45]. Their roles are still largely unknown. Very recently, the T6SS has also been shown to be involved in delivery of toxins to other bacteria [46].

#### The FPI

The 33-kb FPI consists of 16–19 open reading frames and plays a crucial role in the virulence of *F. tularensis* [47]. Notably, the FPI is duplicated in all the subspecies of *F. tularensis* except *F. tularensis* subsp. *novicida*, where it is present in a single copy. The species *Francisella philomiragia* also possesses a single copy of the FPI. Systematic mutational analyses of the FPI-encoded genes have shown that most of them participate in bacterial virulence. Many of the FPI genes have also been repeatedly identified in various genetic screens [15], confirming the critical role of this locus in *F. tularensis* pathogenesis.

In *F. tularensis* subsp. *novicida*, 14 out of the 18 genes within the FPI are required for intramacrophage multiplication [48]. *In silico* analyses have suggested that proteins encoded by the FPI might constitute a T6SS that is phylogenetically distinct from all other T6SS clusters described so far [49]. Indeed, it encodes proteins with limited homology to IcmF (PdpB), IcmH/DotU, VipA (IglA), VipB (IglB) and VgrG. IglC is suggested to be structurally homologous to Hcp [50]. The *F. tularensis* VgrG homolog is significantly smaller than any described VgrG and without an active C-terminal domain. Although it is not yet fully established that the *F. tularensis* FPI encodes a true T6SS, the current hypothesis is that it might secrete effector proteins into the host cytosol. IglC (the Hcp homolog) was the first FPI protein shown to be highly expressed in the host cytosol during *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS infection [51]. Although predominantly cytoplasmic [51], a small fraction of IglC localizes to the bacterial surface [52]. IglC export does not occur in *pdpB*, *dotU*, *iglA* or *iglB* mutants of *F. tularensis* subsp. *novicida*, supporting the notion that its export is T6SS dependent [50]. More recently, Barker *et al.* demonstrated secretion of two additional *F. tularensis* subsp. *novicida* proteins, VgrG and IglI, into the cytosol of infected macrophages [53]. Secretion of these two proteins was demonstrated by using C-terminal CyaA fusions (following the accumulation of cAMP in the host cell cytosol, see below) and N-terminally FLAG-tagged proteins. Strikingly, in contrast to all VgrG proteins reported so far, *F. tularensis* VgrG appeared to be exported into the extracellular milieu in an FPI-independent fashion [53], suggesting a unique mechanism of export. It is still unclear whether IglI secretion into host cells is dependent on core FPI components.

In spite of all the efforts devoted to the FPI and to its potential secreted effectors, its functional role in *F. tularensis* virulence is still largely unknown. At this stage, it is reasonable to assume that (any) FPI-dependent secreted proteins interact with host partner proteins to modify the host (metabolism and/or innate immunity) to the benefit of the bacterium.

#### OM vesicles

Membrane vesicle release is a universal phenomenon shared by bacteria, archae and eukaryotes. The release of vesicles provides a simple and rapid means to respond to many different situations, including environmental changes, as well as for pathogenic bacteria to secrete

virulence factors and deliver toxins or effectors for interacting with the host. OM vesicles (OMVs) are spherical structures (50–250 nm in diameter) released from the surface of many Gram-negative bacteria during cell growth [54]. On their surface, OMVs comprise the same components as the OM from which they derive (i.e., an asymmetric lipid bilayer with lipopolysaccharide [LPS] on the outer leaflet), as well as all the OM-associated proteins (e.g.,  $\beta$ -barrels, lipoproteins [LPPs]). The interior of OMVs contains both periplasmic and cytoplasmic proteins. Although they have been observed for more than three decades, their release mechanism has not yet been fully understood [55].

*Francisella* spp. have recently been shown to produce OMVs when grown to stationary phase in liquid broth [56]. Mass spectrometry analyses of OMVs from *F. tularensis* subsp. *novicida* and *F. philomiragia* led to the identification of hundreds of different proteins, including 166 proteins common to both species. The *Francisella* OMVs also contained significant amounts of chromosomal DNA. In agreement with earlier studies, the *F. tularensis* subsp. *novicida* OMV proteome was composed mainly (60%) of predicted cytoplasmic proteins, including the chaperone GroEL (which was the most abundant protein identified), DnaK and KatG. It also contained predicted OM proteins, including notably PilQ (the Tfp secretin) and TolC, as well as predicted periplasmic and extracellular proteins. Six proteins encoded by the FPI were also identified (PdpA, B and D, and IglA, B and C). Many of the OMV proteins have a demonstrated role in *Francisella* pathogenesis. Hence, OMVs may constitute a genuine ‘vesicle-mediated secretion system’ employed by *Francisella* to deliver virulence factors in the host cytosol. Further experimental work will be required to test this tempting hypothesis.

#### Other secreted/released proteins

In 2006, Lee *et al.* compared the proteins released in the culture medium of the virulent isolate *F. tularensis* subsp. *tularensis* RCI to that of *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, grown in chemically defined medium [57]. The catalase-peroxidases KatG, DnaK and GroEL were among the 12 most abundant proteins found in culture filtrates from both strains. Interestingly, western blot analysis of bacterial proteins released after 10 h of infection of THP-1 macrophages with the virulent RCI strain identified both KatG and GroEL. At present, this observation, suggesting that these two proteins are indeed released in the

cytosol of infected cells, has not been confirmed by other studies.

The *F. tularensis* KatG has the capacity to detoxify bactericidal compounds such as  $H_2O_2$  and  $ONOO^-$  [58]. In this respect, *katG* mutants of both *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 and *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS show enhanced susceptibility to  $H_2O_2$  *in vitro* [59]. However, *katG* inactivation has no effect on intracellular survival of the mutants in macrophages, and only little or no effect *in vivo*. These observations suggest that KatG might protect *Francisella* against reactive oxygen and nitrogen species in other cell types than macrophages and that virulent species possess additional resistance mechanisms.

As mentioned above, the proteomic analysis of OMVs revealed that DnaK, GroEL and KatG were among the major proteins identified in *F. tularensis* subsp. *novicida* [56]. Moreover, KatG has also been detected in *F. tularensis* OM fractions by Huntley *et al.* [60].

#### The acid phosphatase AcpA

Acid phosphatases hydrolyze the phosphoryl groups of phosphomonoesters at acidic pH. *Francisella* subspecies possess at least four acid phosphatases (designated AcpA, B and C, and Hap). The simultaneous loss of all four acid phosphatases in *F. tularensis* subsp. *novicida* has been shown to dramatically affect phagosomal escape, intramacrophage survival and virulence [61]. These effects are less pronounced in *F. tularensis* subsp. *holarctica* and *tularensis* (SCHU S4) [62]. The four acid phosphatases were shown to directly participate to dephosphorylation of the Phox components of the NADPH oxidase, thus preventing their functional assembly and, ultimately, the production of reactive oxygen species. The structure of AcpA, the major acid phosphatase, has been determined [63], and its phosphatase activity has been demonstrated *in vitro*, with purified phosphorylated NADPH oxidase components p40phox and p47phox [62]. AcpA, initially described as an OM protein [64], has also been found in the culture supernatant [56]. Recent studies revealed that AcpA was also secreted by *F. tularensis* subsp. *novicida* U112 within macrophages [65]. Remarkably, immunofluorescence microscopy experiments performed in human monocyte-derived macrophages revealed that as early as 30 min after infection, a minor fraction of AcpA was able to diffuse across the phagosomal membrane into the host cell cytosol with both *F. tularensis* subsp.

*novicida* and *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 strains [65].

However, studies from two different groups of mutants generated in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 have demonstrated that acid phosphatases are completely dispensable for phagosomal escape and intramacrophagic growth, disruption of NADPH oxidase activity in neutrophils and virulence in mice [66,67]. Thus, the significance and relevance of rapid AcpA secretion by *F. tularensis* subsp. *novicida* remains unclear. At this stage, the molecular mechanisms underlying this release are still unknown but have been hypothesized to correspond to fusion events between OMVs and the phagosomal membrane.

Altogether, these data support the notion that the vast majority of the proteins released by *Francisella* in culture originate from OMVs.

#### Surface structures

The importance of extramembranous surface structures (e.g., LPS, capsular material and surface glycoproteins) in *F. tularensis* virulence has been clearly established. The biogenesis of the *Francisella* LPS, its biochemical composition and its role in pathogenesis have been extensively studied (reviewed in [68–70]; see also [71–75] for recent studies) and, therefore, will not be discussed here. We will briefly discuss the production of a peptidic capsular material and surface protein glycosylation.

#### Poly- $\gamma$ -glutamate or not poly- $\gamma$ -glutamate: the cap enigma

The existence and composition of the *F. tularensis* capsule(s) is still a subject of great controversy. Several electron microscopic analyses supported the existence of a *F. tularensis* capsule, whereas other unsuccessful attempts suggested that LPS O-antigen might be the only capsule-like structure [76–78].

The *capBCA* locus was the first gene cluster possibly encoding a capsule that was identified in a signature mutagenesis screen performed in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS [79]. The three genes of this locus share significant similarities with genes within the *capBCADE* locus of *Bacillus anthracis* [80,81], which are responsible for poly- $\gamma$ -glutamate (PGA) synthesis. In *B. anthracis*, PGA synthesis depends primarily on the proteins CapB and CapC, whereas PGA transport requires the presence of the proteins CapA and CapE. Finally, PGA is either anchored to the bacterial surface, via the action of the  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

CapD, or released in the extracellular milieu. The *F. tularensis capBCA* locus (*FTT\_0805–FTT\_0807* in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 strain) has been shown to be necessary for the infection of LVS in a respiratory infection mouse model [82]. More recent studies confirmed the role of this locus in the virulence of the SCHU S4 strain [79,82,83]. Furthermore, deletion of *capB* alone was shown to impair virulence in both *holarctica* and *tularensis* subspecies [79,83]. Confocal microscopy experiments with  $\Delta capB$  and  $\Delta capBCA$  mutants of LVS indicated that these mutants were severely impaired in their ability to escape from the phagosomal compartment of infected human macrophages. Hence, the *capBCA* genes are likely to contribute mainly to the early step of *F. tularensis* intracellular survival, perhaps by producing some kind of PGA. However, no PGA-like material could be detected from *F. tularensis* cultures, even in broth, in experiments performed to date [81,83]. Further studies will be required to conclusively establish the functional role of the *capBCA* locus in the production of a capsular material.

Notably, the recent development of a specific monoclonal antibody led Apicella *et al.* to identify an O-antigen capsular polysaccharide around all *F. tularensis* type A and B strains tested [77]. Mass spectrometry, compositional analysis and nuclear magnetic resonance indicated that the capsule was composed of a polymer of the tetrasaccharide repeat, identical in composition to the LPS O-antigen subunit but corresponding to a structure that was distinct from LPS. Indeed, mutations in genes encoding for O-antigen glycosyltransferases blocked LPS O-antigen and capsule biosynthesis, but mutations in genes encoding for O-antigen polymerase or acyltransferase only prevented LPS O-antigen synthesis, not capsule synthesis.

#### Envelope protein glycosylation

The genetic locus *FTT\_0789–FTT\_0800* of *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*FTL\_1432–FTL\_1421* in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS) contains genes that are potentially involved in polysaccharide biosynthesis, including:

- Four genes encoding putative glycosyltransferases;
- A *galE* homolog (encoding a putative UDP-glucose 4-epimerase);
- One gene encoding a putative ABC transport protein (*FTT\_0793*).



The whole cluster is conserved in subspecies *tularensis* and *holarctica*, whereas the genome of subsp. *novicida* possesses only the four proximal genes of the cluster (corresponding to *FTT\_0789–FTT\_0792*). Most of the genes within this locus have been hit in at least one genetic screen searching for attenuated mutants [72,84–86], strongly supporting the notion that this locus plays an important role in *F. tularensis* virulence. Interestingly, Bandara *et al.* recently isolated a capsule-like material (CLM) in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS after repeated passages in defined medium [78]. The authors found that the *FTL\_1432–FTL\_1421* locus contributed to CLM production. Although the nature of the CLM was not fully characterized, the data revealed that the CLM was distinct from LPS, contained glucose, galactose and mannose and suggested that it might be a glycoprotein.

In a search for genes that are responsible for protein glycosylation in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, Thomas *et al.* recently reported that inactivation of *FTT\_0791* and *FTT\_0798* genes resulted in loss of glycosylation of the LPP DsbA, an essential virulence factor of *F. tularensis* [87–89]. The mutations had no effect on LPS O-antigen biosynthesis. Remarkably, they did not impair bacterial virulence in the mouse model of subcutaneous tularemia, indicating that glycosylation of DsbA does not play a major role in SCHU S4 virulence under these conditions.

A very recent study identified another protein (PglA, *FTT\_0905*, annotated as a type IV pilus glycosylation protein) to be responsible for the glycosylation of DsbA in the *F. tularensis* subsp. *holarctica* virulent strain FSC200 [90]. In addition, Peng *et al.* reported that inactivation of the ortholog of *FTT\_0793* in *F. tularensis* subsp. *novicida* (which also impaired *in vivo* survival [84]) caused increased intracellular bacterial lysis, thus increasing nonspecifically AIM2-dependent pyroptosis and other innate immune signaling pathways [72]. Hence, at least in subsp. *novicida*, the putative ABC transport protein *FTN\_1217* (*FTT\_0793* in SCHU S4) contributes to bacterial membrane integrity during cytosolic growth of the bacterium.

### Other envelope proteins

Several OM proteins have been shown to contribute to *F. tularensis* intracellular survival. These include a OmpA-like protein (*FTT\_0831c* in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 [91]) and FopC (*FTN\_0444* in *F. tularensis* subsp. *novicida* [92,93]), as well as LPPs such as LpnA

(*Tul4*) and the newly identified LPP encoded by the *FTN\_1103* gene in *F. tularensis* subsp. *novicida* [94]. These proteins influence/control the host cell innate immune defenses, either by silencing bacterial recognition by surface TLR2 (LPPs) or by interfering with the intracellular activation pathways (OmpA-like protein and FopC). The mechanisms of host defense subversion have been recently reviewed [95] and will not be discussed further here.

### Transporters

The intracellular niche contains numerous utilizable carbon substrates in variable amounts, various nitrogen, phosphorus and sulfur sources and variable (and most often scarce) sources of essential ions, such as iron, magnesium, zinc and manganese [7,96]. The efficient transport of nutrients is thus critical for intracellular survival. Therefore, these bacteria generally possess multiple specific nutrient uptake systems, many of which are tightly regulated to promote their optimal temporal expression.

Here, we will first recall our current understanding of iron uptake by intracellular *Francisella* and then discuss recent studies on efflux pumps.

### Iron uptake

Iron is an essential cofactor for many enzymes and the ability to acquire iron has been demonstrated to play a critical role in the outcome of numerous bacterial infections. However, many fundamental mechanistic questions about bacterial iron uptake remain unanswered. Ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) is water insoluble and thus requires specialized proteins for its solubilization and to facilitate its mobilization. Mammalian species possess several iron binding and storage proteins (e.g., lactoferrin, transferrin, ferritin and lipocalin) but the majority of mammalian iron exists as heme and hemoglobin. The production of siderophores, which generally chelate iron with a higher affinity than eukaryotic proteins, is one way that pathogenic bacteria utilizes to overcome iron sequestration. Gram-negative bacteria notably possess dedicated envelope uptake systems to bind and internalize ferric siderophore complexes and, in some cases, heme and iron binding proteins [97].

Unlike other intracellular pathogens, which possess numerous iron uptake systems [98], the *F. tularensis* genomes encode only two iron transport systems: a siderophore production and capture system encoded by the *fsl* operon (for *Francisella* siderophore locus; also called *fig*

in the subsp. *novicida*); and a putative ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iron transport system encoded by the *feoA* and *feoB* genes (*FTT\_1403c* and *FTT\_0249*, respectively, in *F. tularensis* subsp. *tularensis*) [99]. Intriguingly, the *F. tularensis* genomes do not encode orthologs of the inner membrane proteins TonB, ExbB and ExbD, which are generally required to energize the iron uptake process in Gram-negative bacteria [100]. In addition, translocation of the ferric siderophore across the inner membrane requires a periplasmic binding protein and specific ABC transporters. The *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 genome encodes only 15 complete ABC transporters, and only three of them are predicted to be importers. Their possible role in iron uptake has not been studied so far. In particular, the *FTT\_0207c–FTT\_0208c–FTT\_0209c* locus is the only locus predicted to encode a divalent ion transport system (predicted zinc/manganese transport system permease protein in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [KEGG] database) that has been identified in earlier genetic screens [10].

As in other bacterial species, these two loci are under the negative control of the Fur repressor (encoded by the *fur* gene, *FTT\_0030c*, in *F. tularensis* subsp. *tularensis*, located immediately upstream of the *fsl* operon) (FIGURE 2). The *fsl* operon is composed of six genes (*fslA* to *fslF*) [101]. The genes *fslA* and *fslC* (*FTT\_0029c* and *FTT\_0027c*, encoding a putative siderophore synthase and a pyridoxal-dependent decarboxylase, respectively) are responsible for the production of a siderophore that is similar in structure to rhizoferrin [102]. The gene *fslE* (*FTT\_0025c*) is assumed to encode the siderophore receptor [91,103,104]. Of note, *FslB* and *FslD* contain putative major facilitator superfamily (MFS) domains (*FTT\_0028c* and *FTT\_0026c*) and, thus, could be involved in siderophore release. Mutants in *fslA*, *fslB* and *fslC* have been found repeatedly in various screens (for reviews, see [15,105]), supporting the notion of the importance of this operon in *F. tularensis* pathogenesis. The *F. tularensis* subsp. *tularensis* genome encodes one *FslE* paralog, designated *FupA* (*FTT\_0918*), which shares 59% amino acid identity with *FslE*. Unlike genes of the Fur-regulated *fsl* operon, expression of *FTT\_0918* is not affected by the iron concentration, implying a different regulation [103]. Both *FslE* and *FupA* proteins are predicted to form  $\beta$ -barrels in the bacterial OM. It was recently demonstrated that these two paralogs function in concert to promote siderophore-dependent and -independent iron uptake [91]. The authors notably showed that *FupA*, but not *FslE*, facilitated high-affinity

$\text{Fe}^{2+}$  uptake. In J774A.1 macrophage-like cells, only the  $\Delta fslE\text{--}\Delta fupA$  double mutant showed significantly impaired multiplication. In a mouse model, the  $\Delta fslE\text{--}\Delta fupA$  double mutant was also significantly more attenuated than the single mutant, suggesting that the two systems function in concert to facilitate iron capture and, hence, contribute to bacterial virulence.

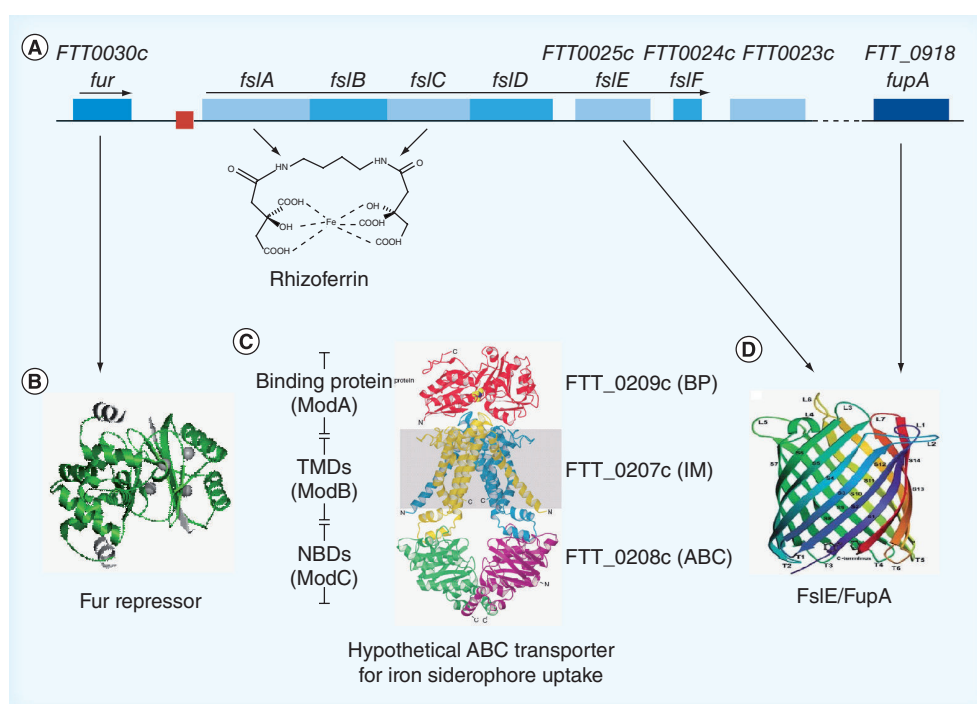
### Efflux pumps

ABC transporters, the MFS of transporters and the resistance–nodulation–division (RND) efflux systems constitute the major modes of resistance to antibacterial drugs. These complexes are generally associated with the OM TolC channel (see above). The MFS (31 proteins) represents the larger subclass of secondary transporters in *F. tularensis* [10]. They are predicted to transport a broad variety of substrates across the inner membrane (via import, export, symport or antiport mechanisms). At present, none of these family members have been functionally characterized. The RND efflux system consists of a tripartite transporter with a cytoplasmic membrane protein (*AcrB*) and a periplasmic membrane fusion protein (*AcrA*) coupled to OM TolC. The *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 genome encodes only four putative RND genes. The *AcrA–AcrB* system is encoded by an operon (*FTT\_0105c* to *FTT\_0107c*) that also comprises the *dsbA* gene (*FTT\_0107c*) that is involved in virulence (see above). In *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, an *acrB* mutant showed attenuated virulence [106]. By contrast, in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, deletions in *acrA* and *acrB* had no impact on either intracellular growth or on virulence in a mouse (when given intranasally) [107]. In spite of these apparently conflicting observations, this RND system might contribute to virulence under other infectious conditions (e.g., other cell types, other routes of infection and/or animal models). The other two RND-like proteins, *FTT\_1115c* and *FTT\_1114c*, are orthologs of the preprotein translocase subunits *SecD* and *SecF*, which associate with the secretory translocon *SecYEG* (*Sec* system) [108].

At present, it cannot be excluded that one (or several) of these efflux systems might be involved in the intracellular delivery of proteins (or peptides) involved in bacterial adaptation to the host cell environment.

### Other proteins

The recent follow-up of a genome-wide *in vivo* negative selection of *F. tularensis* subsp. *novicida* mutants led to the identification of numerous



**Figure 2. Iron uptake in *Francisella tularensis*.** (A) Schematic genetic organization of the *fur-fsl* locus. The red box indicates the Fur binding site. The arrows below selected genes indicate their participation to the production of the Fur repressor (*fur*), the synthesis of the rhizoferrin-like siderophore (*fslA*, *fslC*) and the OM proteins involved in the uptake of the iron-bound siderophore (*fslE*, *fupA*). (B–D) 3D structures of proteins showing sequence similarities to the *Francisella* proteins. (B) The Fur repressor. The structure shown is that of *Vibrio cholerae* (PDB 2w57). The *Francisella* Fur protein shares 38.3% amino acid identity with Fur of *V. cholerae*. (D) FslE and FupA. The structure shown is that of the *Escherichia coli* OmpG barrel (PDB 2iuv). FslE and FupA, which share 59% amino acid identity, are predicted to form a similar 14-stranded  $\beta$ -barrel. (C) The hypothetical ABC transporter that is possibly involved in the translocation of the iron-bound siderophore across the inner membrane. The structure shown is that of the molybdate transporter from *Archaeoglobus fulgidus* (PDB 2ONK), a prototypical bacterial ABC transporter. BP: Periplasmic binding protein; IM: Inner membrane permease.

mutants with impaired intramacrophage survival [109]. One of these mutants, in gene *FTN\_1133*, was particularly studied. *FTN\_1133* is a small protein of 127 amino acid residues in length that shows similarity to the C-terminal domain of the organic hydroperoxide resistance protein (Ohr) from *Bacillus megaterium*. This protein contributes to resistance to reactive oxygen species. Favoring a similar role in *Francisella* species, the mutant *FTN\_1133* showed increased susceptibility to organic hydroperoxides, as well as resistance to the action of the NADPH oxidase *in vitro* and *in vivo*. The subcellular localization and precise contribution of *FTN\_1133* (*FTT\_1152* in SCHU S4) to intracellular survival and multiplication remains to be determined. At this stage, one would assume that it might be particularly important during the phagosomal stage of the intracellular life cycle by reducing the amount of reactive oxygen species in this compartment and interfering with NADPH oxidase assembly.

RipA is a cytoplasmic membrane protein that is conserved among *Francisella* species [110]. Deletion of the *ripA* gene in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (*FTL\_1914*) results in a mutant that escapes the phagosome but is defective for intracellular replication in both macrophages and epithelial cells. The mutant is also attenuated in a pulmonary mouse model of tularemia. Deletion of *ripA* in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 (*FTT\_0181c*) also results in a mutant that is defective for intracellular replication and is attenuated in a mouse model [111]. Although the topological organization of the protein has recently been determined [111], it is not known whether this integral membrane protein is involved in transport activities, and its biological function(s) remain completely obscure.

## Conclusion

*F. tularensis* intracellular adaptation implies the existence of sophisticated regulatory circuits

for the temporal control of numerous virulence genes. Indeed, many transcriptional factors have been shown to regulate the expression of FPI genes, as well as of numerous other genes scattered along the chromosome, including MglA, SspA, FevR (PigR), MigR, PmrA and Hfq (see [112,113]). Remarkably, the intracellular concentration of guanosine tetraphosphate, the alarmone involved in the stringent response in bacteria (which is determined by the products of the *relA* and *spoT* genes) has also been shown to promote the interaction between FevR (PigR) and the RNA polymerase-associated MglA–SspA complex [114]. Hence, it is clear that bacterial metabolic adaptation and expression of so-called ‘virulence’ genes are two interconnected mechanisms that are essential for intracellular survival. Thus, the secretion/release of bacterial proteins, as well as modification of the bacterial envelope, respond to the simultaneous need to adapt to the intracellular lifestyle conditions and control the

host defense mechanisms at the different steps of its infectious cycle.

### Acknowledgement

The authors would like to thank K Meibom for careful reading of the manuscript and helpful comments.

### Financial & competing interests disclosure

This study was funded by INSERM, CNRS and Université René Descartes, Sorbonne Paris Cité. E Ramond is supported by a doctoral fellowship from the ‘Région Ile-de-France’ (DIM-Malinf). G Gesbert is funded by a doctoral fellowship from the ‘Délégation Générale à l’Armement’ (DGA). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## Executive summary

### Secreted proteins

- *Francisella* genomes encode the classical components of the general Sec pathway and three specific secretion machineries: a putative type I secretion system (T1SS), a type II-like secretion system and a type VI-like secretion system, encoded by the *Francisella* pathogenicity island.
- There is no evidence of the presence of intact T3SS or T4SS in *Francisella*.

### The *Francisella* pathogenicity island

- Cytosolic secretion of two *Francisella* pathogenicity island-encoded proteins was demonstrated: VgrG and Igll.
- The secretion of Igll is likely to be T6SS dependent, whereas that of VgrG appears to be T6SS independent.
- IgIC is one of the most upregulated proteins during intramacrophagic growth. IgIC is predominantly cytoplasmic, but a fraction of the protein is exported to the bacterial surface.

### Other secreted proteins

- *Francisella* spp. produce outer membrane vesicles. The *Francisella tularensis* subsp. *novicida* outer membrane vesicle/proteome is composed mainly of cytoplasmic proteins, but also contains outer membrane proteins as well as periplasmic and extracellular proteins.
- Several proteins encoded by the *Francisella* pathogenicity island were also identified in outer membrane vesicles.

### Surface structures

- *F. tularensis* genomes encode several putative polysaccharide and/or polypeptide biogenesis loci that are possibly involved in protein glycosylation and/or capsular material production.
- The nature and genetic basis of the capsule-like surrounding of *F. tularensis* are still not clearly defined.

### Other envelope proteins

- *F. tularensis* genomes encode numerous putative transporters and efflux pumps that may also contribute to the release of peptide or proteins in the host.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
  - of considerable interest
1. Francisella tularensis and Tularemia. Sjøstedt A (Ed.). Fontiers Media SA, Switzerland (2011).
  2. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1105, 30–66 (2007).
  3. McLendon MK, Apicella MA, Allen LA. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 167–185 (2006).
  4. Johansson A, Petersen JM. Genotyping of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *J. AOAC Int.* 93, 1930–1943 (2010).
  5. Gallagher LA, Ramage E, Jacobs MA *et al.* A comprehensive transposon mutant library of *Francisella novicida*, a bioweapon surrogate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 1009–1014 (2007).
  6. Chong A, Celli J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front. Microbiol.* 1, 138 (2010).
- **Comprehensive review on the mechanisms of *F. tularensis* intracellular survival.**



7. Ray K, Marteyn B, Sansonetti PJ, Tang CM. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 333–340 (2009).
8. Appelberg R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1117–1128 (2006).
- **First review linking nutrition and intramacrophage survival.**
9. Hammer ND, Skaar EP. The impact of metal sequestration on *Staphylococcus aureus* metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 10–14 (2012).
- **Comprehensive review on iron capture mechanisms in *Staphylococcus aureus*.**
10. Meibom KL, Charbit A. *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front. Microbiol.* 1, 140 (2010).
11. Knodler LA, Celli J. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell. Microbiol.* 13, 1319–1327 (2011).
12. Ligeon LA, Temime-Smaali N, Lafont F. Ubiquitylation and autophagy in the control of bacterial infections and related inflammatory responses. *Cell. Microbiol.* 13, 1303–1311 (2011).
13. Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 14578–14583 (2006).
- **Describes for the first time autophagy in *F. tularensis* intracellular survival.**
14. Henry T, Monack DM. Activation of the inflammasome upon *Francisella tularensis* infection: interplay of innate immune pathways and virulence factors. *Cell. Microbiol.* 9, 2543–2551 (2007).
15. Meibom KL, Charbit A. The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 11–17 (2010).
16. Asare R, Kwai YA. Exploitation of host cell biology and evasion of immunity by *Francisella tularensis*. *Front. Microbiol.* 1, 145 (2010).
- **Comprehensive review on the evasion of host cell defenses by *F. tularensis*.**
17. Jones JW, Broz P, Monack DM. Innate immune recognition of *Francisella tularensis*: activation of type-I interferons and the inflammasome. *Front. Microbiol.* 2, 16 (2011).
- **Comprehensive review on the innate immune recognition by *F. tularensis*.**
18. Pierini R, Juruj C, Perret M *et al.* AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death Differ.* 19(10), 1709–1721 (2012).
19. Natale P, Bruser T, Driessen AJ. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane – distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1735–1756 (2008).
- **Recent review on the Sec and Tat pathways.**
20. Desvaux M, Hebraud M, Talon R, Henderson IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 17, 139–145 (2009).
21. Forsberg A, Guina T. Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1105, 187–201 (2007).
- **Comprehensive review on the role of type IV pili in *F. tularensis* pathogenesis.**
22. Chandler JC, Molins CR, Petersen JM, Belisle JT. Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies, and subpopulations. *J. Bacteriol.* 193, 3265–3275 (2011).
23. Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00342.x (2012) (Epub ahead of print).
- **Comprehensive review on the surface organelles of Gram-negative bacteria.**
24. Schwarz S, Hood RD, Mougous JD. What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol.* 18, 531–537 (2010).
25. Titball RW, Petrosino JF. *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann. NY Acad. Sci.* 1105, 98–121 (2007).
26. Champion MD, Zeng Q, Nix EB *et al.* Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* 5, e1000459 (2009).
27. Holland IB, Schmitt L, Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol. Membr. Biol.* 22, 29–39 (2005).
28. Eicher T, Cha HJ, Seeger MA *et al.* Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 5687–5692 (2012).
29. Gil H, Platz GJ, Forestal CA *et al.* Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 12897–12902 (2006).
30. Platz GJ, Bublitz DC, Mena P *et al.* A tolC mutant of *Francisella tularensis* is hypercytotoxic compared to the wild type and elicits increased proinflammatory responses from host cells. *Infect. Immun.* 78, 1022–1031 (2010).
31. Kadzhaev K, Zingmark C, Golovliov I *et al.* Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model. *PLoS One* 4, e5463 (2009).
32. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 241–249 (2004).
33. Ayers M, Howell PL, Burrows LL. Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiol.* 5, 1203–1218 (2010).
34. Chakraborty S, Monfett M, Maier TM *et al.* Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect. Immun.* 76, 2852–2861 (2008).
35. Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. novicida type IV pilus. *Microbiology* 154, 2139–2150 (2008).
36. Ark NM, Mann BJ. Impact of *Francisella tularensis* pilin homologs on pilus formation and virulence. *Microb. Pathog.* 51, 110–120 (2011).
37. Konecna K, Hernychova L, Reichelova M *et al.* Comparative proteomic profiling of culture filtrate proteins of less and highly virulent *Francisella tularensis* strains. *Proteomics* 10, 4501–4511 (2010).
38. Forslund AL, Salomonsson EN, Golovliov I *et al.* The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *BMC Microbiol.* 10, 227 (2010).
39. Forslund AL, Kuoppa K, Svensson K *et al.* Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 59, 1818–1830 (2006).
40. Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep.* 9, 735–741 (2008).
41. Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 11–17 (2009).
42. Miyata ST, Kitaoka M, Wieteska L *et al.* The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 1, 117 (2010).
43. Filloux A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity,

- evolution, and function. *Front. Microbiol.* 2, 155 (2011).
- **Comprehensive review on the protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa*.**
44. Bonemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. Tubules and donuts: a type VI secretion story. *Mol. Microbiol.* 76, 815–821 (2010).
45. Schwarz S, West TE, Boyer F *et al.* Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog.* 6, e1001068 (2010).
46. Russell AB, Hood RD, Bui NK *et al.* Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347 (2011).
47. Nano FE, Schmerk C. The *Francisella* pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.* 1105, 122–137 (2007).
48. Broms JE, Meyer L, Lavander M, Larsson P, Sjöstedt A. DotU and VgrG, core components of type VI secretion systems, are essential for *Francisella* LVS pathogenicity. *PLoS One* 7, e34639 (2012).
49. Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Front. Microbiol.* 1, 136 (2010).
50. de Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS *et al.* The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins, IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU, suggest roles in type VI secretion. *Microbiology* 157, 3483–3491 (2011).
51. Golovliov I, Ericsson M, Sandstrom G, Tarnvik A, Sjöstedt A. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect. Immun.* 65, 2183–2189 (1997).
- **First identification of IglC overexpression by cytosolic bacteria.**
52. Ludu JS, de Bruin OM, Duplantis BN *et al.* The *Francisella* pathogenicity island protein PdpD is required for full virulence and associates with homologues of the type VI secretion system. *J. Bacteriol.* 190, 4584–4595 (2008).
53. Barker JR, Chong A, Wehrly TD *et al.* The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol. Microbiol.* 74, 1459–1470 (2009).
- **First demonstration of the secretion of VgrG and IglI in the host cell cytosol.**
54. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957 (2012).
55. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 163–184 (2010).
- **Comprehensive review on the biogenesis of outer membrane vesicles.**
56. Pierson T, Matrakas D, Taylor YU *et al.* Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 10, 954–967 (2011).
57. Lee BY, Horwitz MA, Clemens DL. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 74, 4002–4013 (2006).
58. Lindgren H, Shen H, Zingmark C *et al.* Resistance of *Francisella* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* 75, 1303–1309 (2007).
59. Melillo AA, Bakshi CS, Melendez JA. *Francisella tularensis* antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production. *J. Biol. Chem.* 285, 27553–27560 (2010).
60. Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 189, 561–574 (2007).
61. Mohapatra NP, Soni S, Reilly TJ *et al.* Combined deletion of four *Francisella novicida* acid phosphatases attenuates virulence and macrophage vacuolar escape. *Infect. Immun.* 76, 3690–3699 (2008).
62. Mohapatra NP, Soni S, Rajaram MV *et al.* *Francisella* acid phosphatases inactivate the NADPH oxidase in human phagocytes. *J. Immunol.* 184, 5141–5150 (2010).
63. Felts RL, Reilly TJ, Tanner JJ. Structure of *Francisella tularensis* AcpA: prototype of a unique superfamily of acid phosphatases and phospholipases C. *J. Biol. Chem.* 281, 30289–30298 (2006).
64. Mohapatra N, Balagopal A, Soni S, Schlesinger L, Gunn J. AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infect. Immun.* 75, 390–396 (2007).
65. Dai S, Mohapatra NP, Schlesinger LS, Gunn JS. The acid phosphatase AcpA is secreted *in vitro* and in macrophages by *Francisella* spp. *Infect. Immun.* 80, 1088–1097 (2012).
- **Reports the secretion of AcpA in macrophages.**
66. Child R, Wehrly TD, Rockx-Brouwer D, Dorward DW, Celli J. Acid phosphatases do not contribute to the pathogenesis of type A *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 78, 59–67 (2010).
67. McCaffrey RL, Schwartz JT, Lindemann SR *et al.* Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 88, 791–805 (2010).
68. Gunn JS, Ernst RK. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.* 1105, 202–218 (2007).
69. Raetz CR, Guan Z, Ingram BO *et al.* Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.* 50(Suppl.), S103–S108 (2009).
- **Reviews the biosynthetic pathways of the *F. tularensis* lipopolysaccharide.**
70. Soni S, Ernst RK, Muszynski A *et al.* *Francisella tularensis* blue–gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy. *Front. Microbiol.* 1, 129 (2010).
71. Lindemann SR, Peng K, Long ME *et al.* *Francisella tularensis* SCHU S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect. Immun.* 79, 581–594 (2011).
72. Peng K, Broz P, Jones J, Joubert LM, Monack D. Elevated AIM2-mediated pyroptosis triggered by hypercytotoxic *Francisella* mutant strains is attributed to increased intracellular bacteriolysis. *Cell. Microbiol.* 13, 1586–1600 (2011).
73. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. O-antigen-deficient *Francisella tularensis* live vaccine strain mutants are ingested via an aberrant form of looping phagocytosis and show altered kinetics of intracellular trafficking in human macrophages. *Infect. Immun.* 80, 952–967 (2012).
74. Li Y, Powell DA, Shaffer SA *et al.* LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 8716–8721 (2012).
75. Beasley AS, Cotter RJ, Vogel SN *et al.* A variety of novel lipid A structures obtained from *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Innate Immun.* 18, 268–278 (2012).
76. Zarrella TM, Singh A, Bitsakis C *et al.* Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium’s surface-carbohydrates

- to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One* 6, e22335 (2011).
77. Apicella MA, Post DM, Fowler AC *et al.* Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One* 5, e11060 (2010).
  78. Bandara AB, Champion AE, Wang X *et al.* Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One* 6, e19003 (2011).
  79. Su J, Asare R, Yang J *et al.* The *capBCA* locus is required for intracellular growth of *Francisella tularensis* LVS. *Front. Microbiol.* 2, 83 (2011).
  80. Candela T, Fouet A. Poly- $\gamma$ -glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* 60, 1091–1098 (2006).
  81. Raynaud C, Meibom KL, Lety MA *et al.* Role of the *wbt* locus of *Francisella tularensis* in lipopolysaccharide O-antigen biogenesis and pathogenicity. *Infect. Immun.* 75, 536–541 (2007).
  82. Jia Q, Lee BY, Bowen R *et al.* A *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in *capB*, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge. *Infect. Immun.* 78, 4341–4355 (2010).
  83. Michell SL, Dean RE, Eyles JE *et al.* Deletion of the *Bacillus anthracis capB* homologue in *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* generates an attenuated strain that protects mice against virulent tularemia. *J. Med. Microbiol.* 59, 1275–1284 (2010).
  84. Weiss DS, Brotcke A, Henry T *et al.* *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 6037–6042 (2007).
  - **First *in vivo* negative screening of banks of *F. tularensis* mutants.**
  85. Kraemer PS, Mitchell A, Pelletier MR *et al.* Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice. *Infect. Immun.* 77, 232–244 (2009).
  86. Moule MG, Monack DM, Schneider DS. Reciprocal analysis of *Francisella novicida* infections of a *Drosophila melanogaster* model reveal host–pathogen conflicts mediated by reactive oxygen and *imd*-regulated innate immune response. *PLoS Pathog.* 6, e1001065 (2010).
  87. Straskova A, Pavkova I, Link M *et al.* Proteome analysis of an attenuated *Francisella tularensis dsbA* mutant: identification of potential DsbA substrate proteins. *J. Proteome Res.* 8, 5336–5346 (2009).
  88. Qin A, Scott DW, Rabideau MM, Moore EA, Mann BJ. Requirement of the CXXC motif of novel *Francisella* infectivity potentiator protein B FipB, and FipA in virulence of *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *PLoS One* 6, e24611 (2011).
  89. Thomas RM, Twine SM, Fulton KM *et al.* Glycosylation of DsbA in *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Bacteriol.* 193, 5498–5509 (2011).
  90. Balonova L, Mann BF, Cerveny L *et al.* Characterization of protein glycosylation in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*; identification of a novel glycosylated lipoprotein required for virulence. *Mol. Cell Proteomics* 11, M111.015016 (2012).
  91. Ramakrishnan G, Sen B, Johnson R. Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis tularensis*. *J. Biol. Chem.* 287, 25191–25202 (2012).
  92. Nallaparaju KC, Yu JJ, Rodriguez SA *et al.* Evasion of IFN- $\gamma$  signaling by *Francisella novicida* is dependent upon *Francisella* outer membrane protein C. *PLoS One* 6, e18201 (2011).
  93. Sanapala S, Yu JJ, Murthy AK *et al.* Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. *novicida*  $\Delta$ *fopC* vaccine strain. *Infect. Immun.* 80, 2177–2185 (2012).
  94. Jones CL, Sampson TR, Nakaya HI, Pulendran B, Weiss DS. Repression of bacterial lipoprotein production by *F. novicida* facilitates evasion of innate immune recognition. *Cell. Microbiol.* 14(10), 1531–1543 (2012).
  95. Jones CL, Napier BA, Sampson TR *et al.* Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76(2), 383–404 (2012).
  - **Comprehensive review on the subversion of host cell defenses by intracellular *Francisella*.**
  96. Eisenreich W, Dandekar T, Heesemann J, Goebel W. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 401–412 (2010).
  - **Comprehensive review on the relationship between carbon metabolism and intracellular bacterial survival.**
  97. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1781–1804 (2008).
  98. Hammer ND, Skaar EP. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 129–147 (2011).
  99. Sullivan JT, Jeffery EF, Shannon JD, Ramakrishnan G. Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of *fliA* in siderophore production. *J. Bacteriol.* 188, 3785–3795 (2006).
  100. Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60 (2010).
  101. Deng K, Blick RJ, Liu W, Hansen EJ. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect. Immun.* 74, 4224–4236 (2006).
  102. Ramakrishnan G, Meeker A, Dragulev B. *fliE* is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in *Francisella tularensis* SCHU S4. *J. Bacteriol.* 190, 5353–5361 (2008).
  103. Lindgren H, Honn M, Golovlev I *et al.* The 58-kilodalton major virulence factor of *Francisella tularensis* is required for efficient utilization of iron. *Infect. Immun.* 77, 4429–4436 (2009).
  104. Sen B, Meeker A, Ramakrishnan G. The *fliE* homolog, *FTL\_0439* (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect. Immun.* 78, 4276–4285 (2010).
  105. Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 684–711 (2009).
  106. Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 279, 226–233 (2008).
  107. Qin A, Scott DW, Mann BJ. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 disulfide bond formation protein B, but not an RND-type efflux pump, is required for virulence. *Infect. Immun.* 76, 3086–3092 (2008).
  108. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y *et al.* Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474, 235–238 (2011).
  109. Llewellyn AC, Jones CL, Napier BA, Bina JE, Weiss DS. Macrophage replication screen identifies a novel *Francisella* hydroperoxide resistance protein involved in virulence. *PLoS One* 6, e24201 (2011).
  110. Huang MT, Mortensen BL, Taxman DJ *et al.* Deletion of *ripA* alleviates suppression of the

- inflammasome and MAPK by *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 185, 5476–5485 (2010).
111. Mortensen BL, Fuller JR, Taft-Benz S, Collins EJ, Kawula TH. *Francisella tularensis* RipA protein topology and identification of functional domains. *J. Bacteriol.* 194, 1474–1484 (2012).
  112. Meibom KL, Barel M, Charbit A. Loops and networks in control of *Francisella tularensis* virulence. *Future Microbiol.* 4, 713–729 (2009).
  113. Dai S, Mohapatra NP, Schlesinger LS, Gunn JS. Regulation of *Francisella tularensis* virulence. *Front. Microbiol.* 1, 144 (2010).
    - **Comprehensive review on the regulatory systems of *F. tularensis*.**
  114. Charity JC, Blalock LT, Costante-Hamm MM, Kasper DL, Dove SL. Small molecule control of virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 5, e1000641 (2009).
    - **Demonstrates the role of guanosine tetraphosphate in *F. tularensis* gene regulation and virulence.**

**Annexe 2 : Glutamate utilization couples oxidative  
stress defense and the tricarboxylic acid cycle in  
*Francisella* phagosomal escape**



# Glutamate Utilization Couples Oxidative Stress Defense and the Tricarboxylic Acid Cycle in *Francisella* Phagosomal Escape

Elodie Ramond<sup>1,2</sup>, Gael Gesbert<sup>1,2</sup>, Mélanie Rigard<sup>3,4</sup>, Julien Dairou<sup>5</sup>, Marion Dupuis<sup>1,2</sup>, Iharilalao Dubail<sup>1,2</sup>, Karin Meibom<sup>1,2</sup>, Thomas Henry<sup>3,4</sup>, Monique Barel<sup>1,2</sup>, Alain Charbit<sup>1,2\*</sup>

**1** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Bâtiment Leriche, Paris, France, **2** INSERM, U1002, Unité de Pathogénie des Infections Systémiques, Paris, France, **3** Centre international de recherche en infectiologie, Université de Lyon, Lyon, France, **4** Bacterial Pathogenesis and Innate Immunity Laboratory, INSERM U851 "Immunity, Infection and Vaccination", Lyon, France, **5** Platform "Bioprofiler" Université Paris Diderot, Paris, France

## Abstract

Intracellular bacterial pathogens have developed a variety of strategies to avoid degradation by the host innate immune defense mechanisms triggered upon phagocytosis. Upon infection of mammalian host cells, the intracellular pathogen *Francisella* replicates exclusively in the cytosolic compartment. Hence, its ability to escape rapidly from the phagosomal compartment is critical for its pathogenicity. Here, we show for the first time that a glutamate transporter of *Francisella* (here designated GadC) is critical for oxidative stress defense in the phagosome, thus impairing intra-macrophage multiplication and virulence in the mouse model. The *gadC* mutant failed to efficiently neutralize the production of reactive oxygen species. Remarkably, virulence of the *gadC* mutant was partially restored in mice defective in NADPH oxidase activity. The data presented highlight links between glutamate uptake, oxidative stress defense, the tricarboxylic acid cycle and phagosomal escape. This is the first report establishing the role of an amino acid transporter in the early stage of the *Francisella* intracellular lifecycle.

**Citation:** Ramond E, Gesbert G, Rigard M, Dairou J, Dupuis M, et al. (2014) Glutamate Utilization Couples Oxidative Stress Defense and the Tricarboxylic Acid Cycle in *Francisella* Phagosomal Escape. PLoS Pathog 10(1): e1003893. doi:10.1371/journal.ppat.1003893

**Editor:** David Weiss, Emory University School of Medicine, United States of America

**Received:** July 1, 2013; **Accepted:** December 5, 2013; **Published:** January 16, 2014

**Copyright:** © 2014 Ramond et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** These studies were supported by INSERM, CNRS and Université Paris Descartes Paris Cité Sorbonne. Elodie Ramond was funded by a fellowship from the "Région Ile de France" and Gael Gesbert by a fellowship from the "Délégation Générale à l'Armement" (DGA). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: alain.charbit@inserm.fr

## Introduction

*Francisella tularensis* is a Gram-negative bacterium causing the disease tularemia in a large number of animal species. This highly infectious bacterial pathogen can be transmitted to humans in numerous ways [1], including direct contact with sick animals, inhalation, ingestion of contaminated water or food, or by bites from ticks, mosquitoes or flies. Four different subspecies (subsp.) of *F. tularensis* that differ in virulence and geographic distribution exist, designated subsp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*, respectively. The *tularensis* subspecies is the most virulent causing a severe disease in humans [2,3]. *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) is rarely pathogenic to non-immuno-compromized humans but is fully virulent for mice and is therefore widely used as a model to study *Francisella* intracellular parasitism.

*F. novicida* has the capacity to evade host defenses and to replicate to high numbers within the cytosol of eukaryotic cells [4]. The bacterium is able to enter and to replicate inside a variety of cells, and in particular in macrophages. After a transient passage through a phagosomal compartment, bacteria are released within 30–60 minutes in the host cell cytosol where they undergo several rounds of active replication [1]. Upon *Francisella* entry into macrophages, the phagosomal compartment transiently acidifies and the activation of NADPH oxidase leads to the production of

noxious oxygen reactive species [5]. Although several genes required for phagosomal escape have been identified ([6,7] and references therein), the molecular mechanisms underlying this complex process are still very poorly understood.

Protection against oxidative stress includes the production of anti-oxidant molecules (such as glutathione and NADPH) and of enzymes (such as catalases, superoxide dismutases glutaredoxin-related protein and alkylhydroperoxide reductases). *Francisella* subspecies encode a whole set of such oxidative stress-related enzymes [8]. Inactivation of the corresponding genes generally leads to increased sensitivity to oxidative stress, defective intracellular multiplication, and attenuated virulence [9,10,11]. Protection against oxidative and other stress also involves a number of dedicated protein chaperones and chaperone complexes [12].

In contrast, the importance of acid-resistance mechanisms in *Francisella* intracellular survival remains controversial [13,14,15] and their possible contribution to pathogenesis still largely unknown. One of the best characterized acid-resistance systems in bacteria couples the glutamate:γ-aminobutyrate exchanger GadC with the glutamate decarboxylase(s) GadA and/or GadB [16]. The decarboxylase replaces the α-carboxyl group of its amino acid substrate with a proton that is consumed from the cytoplasmic pool [17]. The capacity to produce γ-aminobutyric

## Author Summary

Intracellular bacterial pathogens have developed a variety of strategies to avoid degradation by the host innate immune defense mechanisms triggered upon phagocytosis. We show here for the first time that glutamate acquisition is essential for phagosomal escape and virulence of an intracellular pathogen. Remarkably, inactivation of the glutamate transporter GadC of *Francisella* impaired the capacity of the bacterium to neutralize reactive oxygen species (ROS) production in the phagosome. Virulence of the *gadC* mutant was partially restored in mice with a defective NADPH oxidase. Importantly, we found that impaired glutamate uptake affected the production of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates, highlighting novel links between the TCA cycle and bacterial phagosomal escape. Amino acid transporters are, thus, likely to constitute underscored players in microbial intracellular parasitism.

acid (GABA) through glutamate decarboxylation has been observed in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The GadC/GadB glutamate decarboxylase (GAD) system has been shown to play an essential role in acid tolerance in food-borne bacterial pathogens that must survive the potentially lethal acidic environments of the stomach before reaching the intestine. Some bacteria possess a unique permease-decarboxylase pair whereas others, like *Listeria monocytogenes* [18], encode several paralogues of each component.

Recent genome sequence analyses and genome-scale genetic studies suggest that an important proportion of genes related to metabolic and nutritional functions participate to *Francisella* virulence [19]. However, the relationship between nutrition and the *in vivo* life cycle of *F. tularensis* remain poorly understood. *Francisella* is predicted to possess numerous nutrient uptake systems to capture its necessary host-derived nutrients, some of which are probably available in limiting concentrations. Notably, we showed very recently that an asparagine transporter of the major facilitator superfamily of transporters was specifically required for cytosolic multiplication of *Francisella* and its systemic dissemination [20].

The amino acid-polyamine-organocation family of transporters (APC) is specifically involved in amino acid transport [19]. Remarkably, eight of the 11 APC members have been identified at least once in earlier genetic studies, and are likely to be involved in bacterial virulence. In particular, the gene encoding the GadC permease has been identified in several different genome-wide screens, performed in either *F. tularensis* subsp. *holarctica* [21] or *F. novicida* [22,23,24].

In the present work, we elucidate the functional role of the GadC protein in *Francisella* pathogenesis. We show that glutamate uptake plays a critical role in *Francisella* oxidative stress defense in the phagosomal compartment. Strikingly, the activity of GadC influences the expression of metabolic genes and the production of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates, unraveling a relationship between oxidative stress defense, metabolism and *Francisella* virulence.

## Results

### The Gad system of *Francisella*

*F. tularensis* subspecies possess a unique putative GAD system, composed of the antiporter GadC and a decarboxylase GadB (encoded by genes *FTN\_0571* and *FTN\_1701* in *F. novicida* and hereafter designated *gadC* and *gadB*, respectively for simplification)

(**Figure S1A**). The transcription of *gadC* is initiated 27 nucleotides upstream of the translational start from a predicted  $\sigma^{70}$  promoter (**Figure S1B**). This genetic organization is highly conserved in all the available *F. tularensis* genomes (not shown). The gene *gadC* encodes a protein of 469 amino acids sharing 98.7%, 99.1% and 99.6% identity with its orthologues in the subspecies *mediasiatica* (*FTM\_1423*), *holarctica* (*FTL\_1583*) and *tularensis* (*FTT\_0480c*), respectively.

The *Francisella* GadC protein is predicted as a putative glutamate: $\gamma$ -aminobutyric acid (GAD) antiporter (KEGG database). Although it shows only modest homology (approximately 25% amino acid identity) with GadC of *E. coli* [25], secondary structure prediction (using the method for prediction of transmembrane helices HMM available at the internet site [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) indicates that the GadC transporter of *Francisella* also comprises 12 transmembrane helices and has its N and C-terminal ends facing the cytoplasm (not shown).

The *gadB* gene encodes a putative glutamate decarboxylase protein of 448 amino acid residues that is highly conserved in *F. tularensis* subsp. *tularensis* (98.7% amino acid identity with *FTT\_1722c*). However, the corresponding protein is truncated at its C-terminal end in the subspecies *holarctica* (*FTL\_1863*) and *mediasiatica* (*FTM\_1673*, and noted as a pseudogene in the KEGG database).

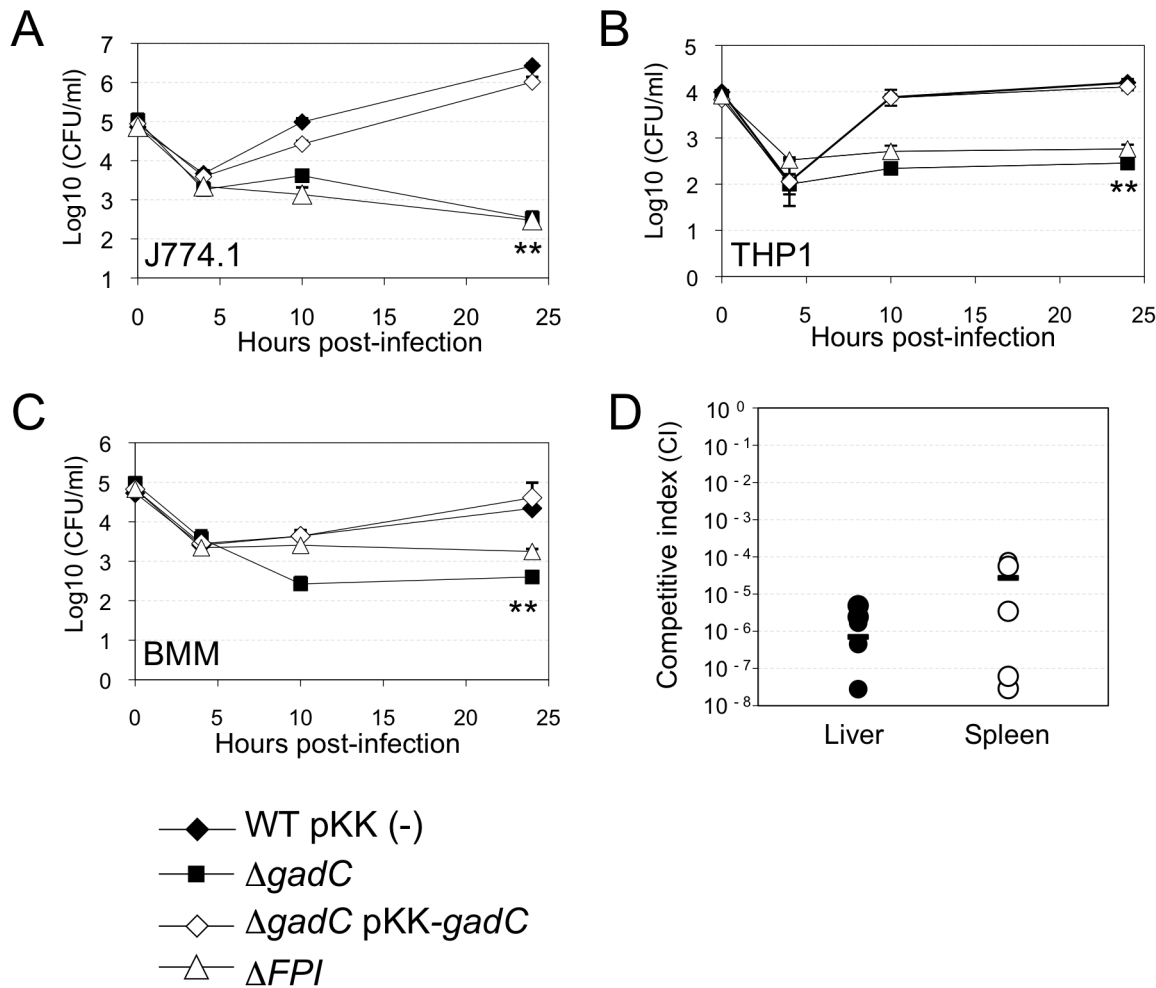
### Role of GadC in bacterial intracellular multiplication and virulence

We constructed a strain with chromosomal deletion of the entire *gadC* gene in *F. novicida* by allelic replacement [26]. We confirmed that the  $\Delta$ *gadC* mutation did not have any polar effect on the downstream gene *FTN\_0570* by quantitative qRT-PCR (**Figure S1C**). The growth kinetics of the parental *F. novicida* strain and the  $\Delta$ *gadC* mutant were indistinguishable in tryptic soya broth (TSB) and chemically defined medium (CDM) [27] liquid media at 37°C (**Figure S2**), indicating that inactivation of *gadC* had no impact on bacterial growth in broth.

We examined the ability of wild-type *F. novicida*, the  $\Delta$ *gadC* mutant and a  $\Delta$ *gadC* mutant strain complemented with a plasmid-encoded copy of wild-type *gadC*, to survive in murine and human macrophage cell lines and primary bone marrow-derived mouse macrophages, over a 24 h-period. The  $\Delta$ *gadC* mutant showed a severe growth defect in J774.1 cells, comparable to that of a mutant deleted of the entire *Francisella* pathogenicity island ( $\Delta$ *FPI* mutant), with more than a 30-fold reduction of intracellular bacteria after 10 h and a 1,000-fold reduction after 24 h (**Figure 1A**). Impaired multiplication of the  $\Delta$ *gadC* mutant was also observed in THP-1 macrophages (**Figure 1B**) as well as in bone marrow-derived macrophages (**Figure 1C**). In all cell types tested, introduction of the complementing plasmid (pKK-*gadC*) restored bacterial viability to same level as in the wild-type parent, confirming the specific involvement of the *gadC* gene in intracellular survival.

Next, *in vivo* competition assays in BALB/c mice were performed to determine if the GadC protein played a role in the ability of *Francisella* to cause disease. Five mice (6- to 8-week old) were inoculated by the intraperitoneal (i.p.) route with a 1:1 mixture of wild-type *F. novicida* and  $\Delta$ *gadC* mutant strains. Bacterial multiplication in the liver and spleen was monitored at day 2 post-infection (**Figure 1D**). The Competition Index (CI), calculated for both organs, was extremely low ( $10^{-6}$ ) demonstrating that the gene *gadC* played an essential role in *Francisella* virulence in the mouse model.

Upon *Francisella* entry into cells, *Francisella* initially resides in a phagosomal compartment that transiently acidifies and that



**Figure 1. *gadC* inactivation affects intracellular survival and virulence.** Intracellular replication of wild-type *F. novicida* (WT) carrying the empty plasmid pKK214 (WT/pKK(-)), of the  $\Delta gadC$  mutant ( $\Delta gadC$ ) and complemented strain ( $\Delta gadC$ /pKK-gadC), and of the  $\Delta FPI$  mutant ( $\Delta FPI$ ), was monitored in J774.1 macrophage-like cells (A); in THP-1 human macrophages (B); and in bone marrow-derived macrophages (C), over a 24 h-period. Results are shown as the average of  $\log_{10}$  cfu  $\text{mL}^{-1} \pm$  standard deviation. Each experiment was performed in triplicate. \*\*,  $p < 0.01$  (as determined by the Student's *t*-test). Competition assays (D). A group of five female BALB/c mice were infected i.p. with a 1:1 mixture of wild-type *F. novicida* and  $\Delta gadC$  mutant strains (100 colony forming units (cfu) of each). The data represent the competitive index (CI) value for cfu of mutant/wild-type in the liver (L: black diamonds, left column) and spleen (S: black circles, right column) of each mouse, 48 h after infection. Bars represent the geometric mean CI value.

doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g001

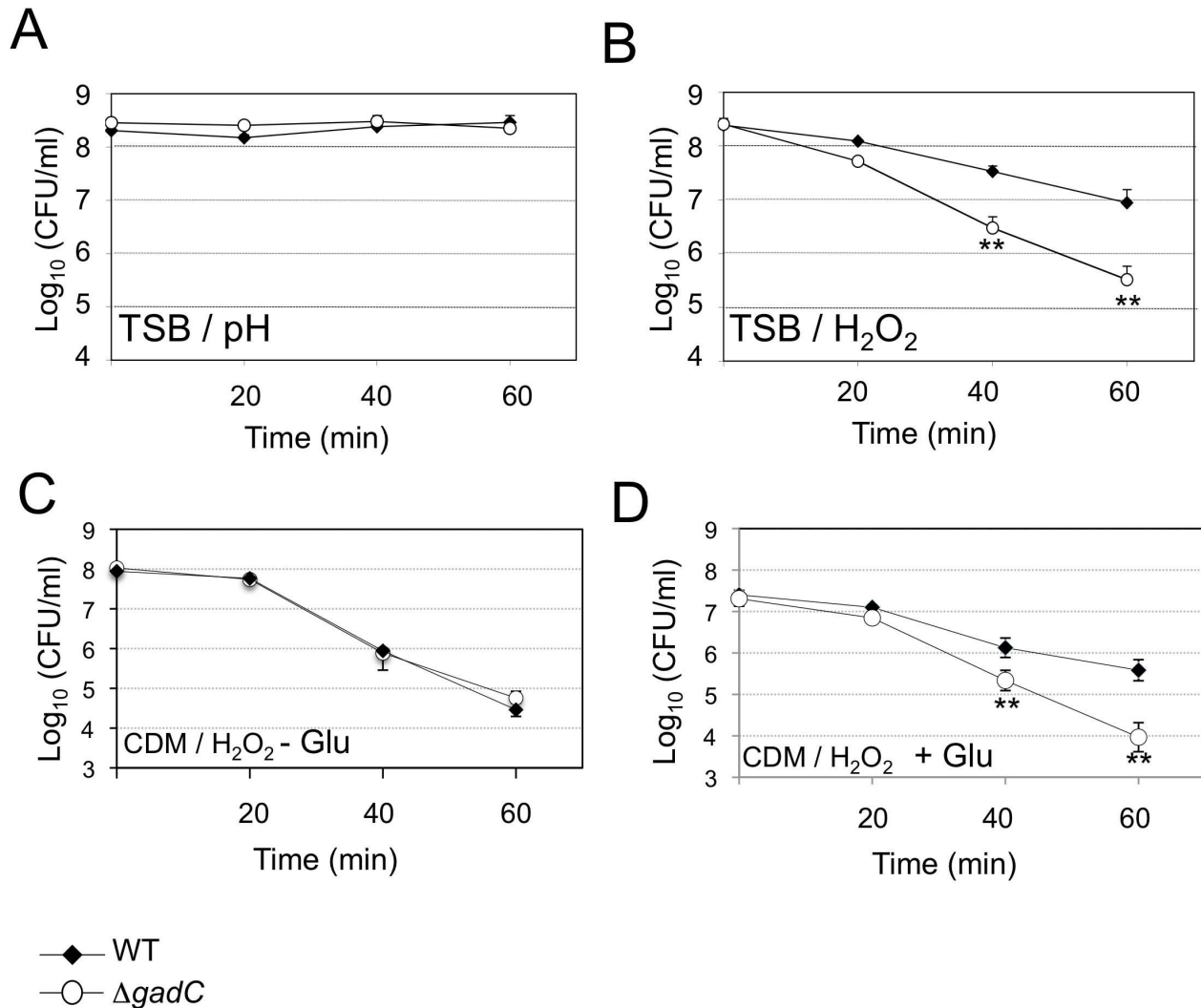
acquires reactive oxygen species. We therefore examined the ability of wild-type and  $\Delta gadC$  mutant strains to survive under acid or oxidative stress conditions. For this, bacteria were exposed either to pH 5.5 or to 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 2). Under the pH condition tested, the viability of two strains was unaffected (Figure 2A). It should be noted that at the lower pH of 2.5, the viability of both wild-type and  $\Delta gadC$  mutant was equally reduced (approximately 2 logs, not shown). In contrast, the  $\Delta gadC$  mutant strain appeared to be significantly more sensitive to oxidative stress than the wild-type strain in TSB (Figure 2B). After 40 min of exposure, it showed a 10-fold decrease in the number of viable bacteria and an approximately 50-fold decrease after 60 min of exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Remarkably, in CDM, the wild-type and  $\Delta gadC$  mutant strains were equally sensitive to  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the absence of glutamate supplementation (Figure 2C). However, upon glutamate supplementation, the wild-type strain showed increased resistance to  $\text{H}_2\text{O}_2$  whereas the  $\Delta gadC$  strain was unaffected (Figure 2D).

### GadC is involved in phagosomal escape

Confocal and electron microscopy analyses demonstrated that the  $\Delta gadC$  mutant had lost the capacity to escape from the phagosomal compartment of infected macrophages.

**Confocal microscopy.** We used the differential solubilization process previously described [28] to follow the sub-cellular localization of the  $\Delta gadC$  mutant in infected cells (Figure 3A). Briefly, the plasma membrane was selectively permeabilized with digitonin. This treatment allowed the detection of cytoplasmic bacteria and proteins. Subsequent treatment with saponin rendered intact phagosomes accessible to antibodies and allowed the detection of intra-phagosomal bacteria. Intracellular localization of the bacteria or LAMP-1 (used as a specific marker of phagosomes) was analyzed using specific antibodies and their co-localization was quantified with the ImageJ software (Figure 3B). Merging of LAMP-1 and bacteria was obtained at all three 3 time-point tested in cells infected with the  $\Delta gadC$  or  $\Delta FPI$  mutant strains. With both mutants, bacterial co-localization with LAMP-1





**Figure 2. Stress sensitivity.** Exponential phase bacteria, diluted in TSB medium, were subjected: (A) to acidic stress (pH 5.5), or (B) to oxidative stress (500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Exponential phase bacteria, diluted in chemically defined medium (CDM) (C), or CDM supplemented with 1 mM glutamate (D), were subjected to oxidative stress (500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The bacteria were plated on chocolate agar plates at different times and viable bacteria were monitored 2 days after. Data are the average cfu mL<sup>-1</sup> for three points. Experiments were realized twice. \*\*,  $p < 0.01$  (as determined by the Student's *t*-test).

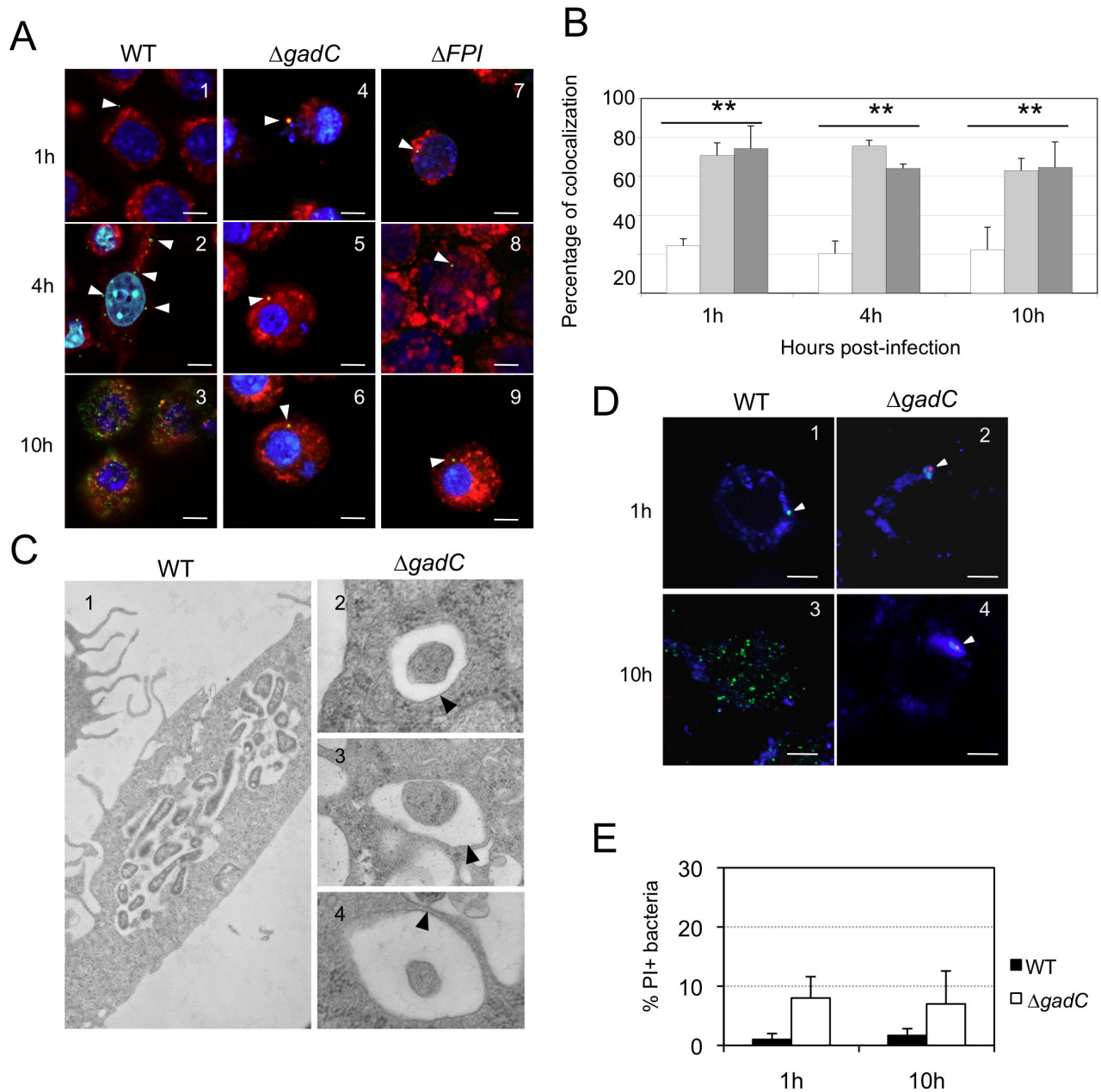
doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g002

was elevated (70% and 74%, with  $\Delta$ *gadC* and  $\Delta$ *FPI*, respectively) after 1 h and remained very high after 4 h (75% and 64% with  $\Delta$ *gadC* and  $\Delta$ *FPI*, respectively) and after 10 h (63% and 64% with  $\Delta$ *gadC* and  $\Delta$ *FPI*, respectively). In contrast, co-localization of the wild-type strain with LAMP-1 was only around 24% after 1 h and remained in the same range throughout the infection (20% and 22%, after 4 h and 10 h, respectively). These results strongly suggest that the  $\Delta$ *gadC* mutant is still trapped in the phagosomal compartment after 10 h, as the  $\Delta$ *FPI* mutant, whereas the wild-type strain has already escaped into the cytosol after 1 h.

**Electron microscopy.** To confirm this result, we performed thin section electron microscopy of J774.1 cells infected either with wild-type *F. novicida* or with the  $\Delta$ *gadC* mutant (Figure 3C). As expected, significant bacterial replication was observed in the cytosol of most infected cells 10 h post-infection with wild-type *F. novicida* whereas bacterial multiplication was severely impaired in cells infected with the  $\Delta$ *gadC* mutant. Furthermore, mutant bacteria surrounded by intact phagosomal membrane were still observed after 10 h of infection.

**Bacterial death.** We then determined whether the  $\Delta$ *gadC* mutant bacteria, trapped in the phagosomal compartment of J774.1 macrophages, remained alive. For this, bacteria were subjected to an intracellular viability assay [29]. As illustrated in Figure 3D and quantified (Figure 3E), the majority of the replication-deficient  $\Delta$ *gadC* mutant bacteria (>85%) were alive after 10 h of infection.

Infection of murine bone marrow derived macrophages (BMM) with wild-type *F. novicida* results in activation of the AIM2 inflammasome and pyroptosis [30,31,32], which can be monitored by real time incorporation of the membrane-impermeable dye propidium iodide [33]. Therefore, we compared the cell death kinetics of BMM infected either with the wild-type strain or with the  $\Delta$ *gadC* mutant. As previously shown [33], infection with wild-type *F. novicida* triggered macrophage death after 6–8 h, while infection with the vacuolar mutant ( $\Delta$ *FPI* mutant) had no effect on cellular viability during the time frame of the experiment. In agreement with its inability to escape from the vacuole and to replicate within host cell, the  $\Delta$ *gadC* mutant behaved as a  $\Delta$ *FPI* mutant and was unable to trigger host cell death (Figure S3).



**Figure 3. Subcellular localization of the  $\Delta gadC$  mutant.** (A) Co-localization of wild-type *F. novicida* (1, 2, 3),  $\Delta gadC$  (4, 5, 6) or  $\Delta FPI$  mutant strain (7, 8, 9) with LAMP-1 was monitored by confocal microscopy, in J774.1 macrophage cells. Co-localization was monitored at 1 h (1, 4, 7), 4 h (2, 5, 8) and 10 h (3, 6, 9). Anti-*Francisella* antibody was used at a final dilution of 1:500 and is shown in green. Anti-LAMP-1 antibody was used at a final dilution of 1:100 and is shown in red. White arrowheads point to individual bacteria. Cell nuclei were labeled with DAPI (in blue). The images are representative from triplicate coverslips in three independent experiments. Scale bars at the bottom right of each panel correspond to 10  $\mu$ M. (B) Quantification of co-localization between bacteria and LAMP-1 was obtained with Image J software. The graph results from the analysis of 4 different fields for each time of infection, in three independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$  (as determined by the Student's *t*-test). White bars, *F. novicida* U112 (WT); light grey bars,  $\Delta gadC$ ; dark grey bars,  $\Delta FPI$ . (C) Transmission electron micrographs of thin sections of J774.1 macrophages, infected by wild-type *F. novicida* and  $\Delta gadC$  mutant strains. Infections were monitored over a 10 h-period. At 10 h, active cytosolic multiplication of wild-type *F. novicida* was observed in most of the infected cells (1) whereas the  $\Delta gadC$  mutant remains trapped into spacious phagosomes (2, 3, 4). Black arrowheads point to intact phagosomal membrane. (D) To evaluate the viability of intracellular *Francisella*, labeling with the cell-impermeant nucleic acid dye propidium iodide (PI) was performed. Confocal images of J774.1 cells, infected with wild-type *F. novicida* (1, 3) or  $\Delta gadC$  mutant (2, 4) strain; after 1 h (1, 2) and 10 h of infection (3, 4). Intact bacteria are labeled in green. Bacteria with compromised membranes are labeled with PI and appear in red (or a red spot). Phagosomes are labeled in blue. Scale bars at the bottom right of each panel correspond to 10  $\mu$ M. (E) Quantification of the percentage of dead bacteria. At least 100 bacteria per experiment were scored for PI labeling at 1 h and 10 h post infection. Data are means  $\pm$  standard deviation from three independent assays. doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g003

## *F. tularensis* *gadC* encodes a genuine glutamate transporter

Earlier phylogenetic studies have distinguished ten distinct subfamilies within the APC family of transporters, inferring possible substrate specificities. Consensus signature motifs were defined for each of them [34]. Inspection of the *Francisella* GadC protein reveals a signature sequence of the Glutamate-GABA antiporter subfamily in its N-proximal portion (**Figure 4A**), prompting us to test functional complementation of an *E. coli* *gadC* mutant by the *Francisella* *gadC* orthologue.

Functional complementation (**Figure 4B**) was determined by comparing the acid resistance (at pH 2.5) of a *gadC*-inactivated strain of *E. coli* (EF491) to the same strain carrying a plasmid-borne *F. novicida* *gadC* gene (pCRT-*gadC*). As a positive control, we used the *E. coli* *gadC* mutant complemented with the wild-type *E. coli* *gadC* gene (EF547). IPTG-induced expression of the *Francisella* *gadC* allele in the *E. coli* *gadC* mutant strain restored acid resistance to wild-type level, indicating that the *Francisella* GadC protein displays the acid-resistance function of the *E. coli* GadC protein.

To further support the role of GadC in glutamate entry, we quantified the amounts of intracellular glutamate by HPLC analysis, in the wild-type and  $\Delta$ *gadC* strains grown in CDM supplemented with 1.5 mM of glutamate (in the presence or in the absence of hydrogen peroxide). As shown in **Fig. 4C**, the concentration of intracellular glutamate was significantly lower in the  $\Delta$ *gadC* mutant than in the wild-type strain, both in the absence (84% reduction in concentration) or in the presence (31% reduction) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We also quantified the amount of glutamate in culture supernatants of the two strains in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (not shown). External glutamate present in the culture medium of the wild-type strain was 39% lower than that of the  $\Delta$ *gadC* mutant.

Altogether these data are compatible with a reduced capacity of the  $\Delta$ *gadC* mutant to take up external glutamate.

We then directly evaluated the impact of *gadC* inactivation on glutamate uptake by live *F. novicida*. For this, we compared the uptake of radiolabeled glutamate (<sup>14</sup>C-Glu) by wild-type *F. novicida* to that of the  $\Delta$ *gadC* mutant, over a broad range of glutamate concentrations (**Fig. 4D**). Incorporation of <sup>14</sup>C-Glu was significantly affected in the  $\Delta$ *gadC* mutant (representing only approximately 50% of the wild-type values at each concentration tested), confirming that GadC is a genuine glutamate transporter. The fact that glutamate uptake was not totally abolished in the  $\Delta$ *gadC* mutant suggests that other transporter(s) allow the entry of glutamate in this strain.

## The *gadC* mutant shows impaired control of ROS production

We compared the amount of reactive oxygen species (ROS) in J774.1 cells infected either with wild-type *F. novicida*,  $\Delta$ *gadC* or the  $\Delta$ *FPI* strain, over a 60 min period. For this, we used the H<sub>2</sub>DCF-DA assay (Sigma-Aldrich Co). H<sub>2</sub>DCF-DA is a non-fluorescent cell-permeable compound that has been widely used for the detection of ROS [35]. Once inside the cell, this compound is first cleaved by endogenous esterases to H<sub>2</sub>DCF. The de-esterified product becomes the highly fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation by ROS. The ROS content increased by 25% after 60 min in cells infected with wild-type *F. novicida* (**Figure 5**). A comparable increase was recorded with the  $\Delta$ *FPI* mutant. However, in cells infected with the  $\Delta$ *gadC* mutant, the ROS content was significantly higher than that recorded with the two other strains at each time point (25% higher at 15 min, and 55% higher after 60 min). These results suggest that the  $\Delta$ *gadC* mutant is affected in its ability to neutralize the production of ROS

in the phagosomal compartment. Alternatively, the  $\Delta$ *gadC* mutant may trigger an increased production of ROS.

## Impaired virulence of the *gadC* mutant is abrogated in NADPH oxidase KO mice

This result prompted us to evaluate the pathogenicity of the  $\Delta$ *gadC* mutant in mice lacking a functional NADPH oxidase complex, both *in vitro* and *in vivo*.

**In vitro.** Intracellular replication of the  $\Delta$ *gadC* mutant was monitored in bone marrow-derived macrophages from wild-type control mice or homozygotes gp91<sup>phox-/-</sup> in the same C57BL/6J background (designated WT and phox-KO BMMs, respectively) (**Figure 6A, 6B**). Multiplication of wild-type *F. novicida* and the  $\Delta$ *gadC*/pKK*gadC*-complemented strain was similar at all time points tested in the two types of BMMs. In contrast, the  $\Delta$ *gadC* mutant showed a significantly more severe intracellular multiplication defect in WT BMMs than in phox-KO BMMs. Indeed, the number of  $\Delta$ *gadC* mutant bacteria was 10-fold lower than that of wild-type *F. novicida* already after 10 h in WT BMMs, and was 1,000-fold lower after 24 h (**Fig. 6A**). In BMM from phox-KO mice, multiplication of the mutant strain was 1/3 that of wild-type *F. novicida* after 10 h, and 100-fold higher than what was observed in WT macrophages after 24 h (**Figure 6B**). These results showed that multiplication of the  $\Delta$ *gadC* mutant was mostly restored in BMMs having a defective NADPH oxidase.

**In vivo.** We also performed *in vivo* competition assays in these mice (**Figure 6C, 6D**), as described above for the BALB/c mice. The Competition Index (CI) calculated for both target organs was 10<sup>-4</sup> in WT mice (**Figure 6C**). In contrast, the CI was 100-fold higher in phox-KO mice (10<sup>-2</sup>, **Figure 6D**). This result comforts the data obtained in BMM cells and demonstrates that, in mice that are unable to produce ROS in the phagosome, the multiplication defect of the  $\Delta$ *gadC* mutant is partially suppressed. However, the fact that the  $\Delta$ *gadC* multiplication defect was not completely abolished suggests that oxidative stress may not be the only host restrictive factor.

Altogether, these *in vitro* and *in vivo* data obtained in phox-KO mice strongly suggest that GadC specifically contributes to the ROS defense of *Francisella* in the phagosomal compartment.

## Impact of *gadC* inactivation in glutamate on metabolism

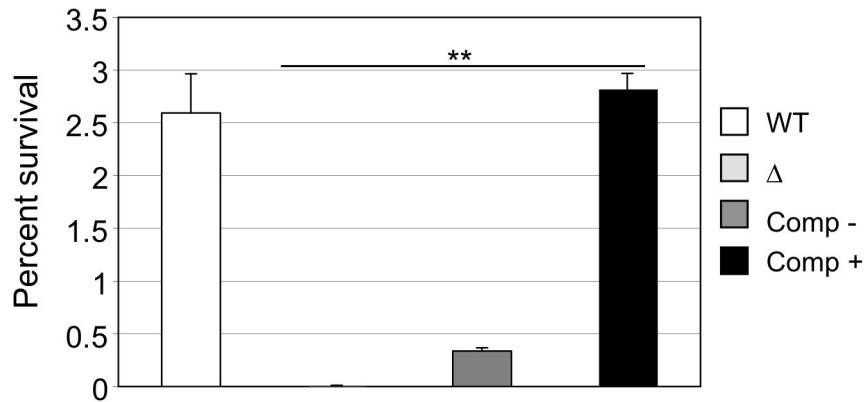
Intracellular glutamate plays a central role in a wide range of metabolic processes in bacteria. In order to evaluate the potential impact of the *gadC* inactivation on bacterial glutamate metabolism, we first quantitatively monitored the transcription of selected genes connecting glutamate utilization to either the TCA cycle or to glutathione biogenesis. This analysis was done for wild-type *F. novicida* and for the  $\Delta$ *gadC* mutant strain, grown in broth with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 7A**).

Expression of *FTN\_0593* (*sucD*), *FTN\_0127* (*gabD*) and *FTN\_1532* (*gdhA*), was significantly decreased in the  $\Delta$ *gadC* mutant under oxidative stress, whereas their expression was moderately increased in the wild-type strain. Expression of *FTN\_0277* (*gshA*) and *FTN\_0804* (*gshB*) was reduced in both strains, under oxidative stress. However, the decrease was significantly less important (app. 4-fold) in the  $\Delta$ *gadC* mutant than in the wild-type strain. Expression of *FTN\_1635* (*sucA*) was significantly decreased in both strains under oxidative stress. These data indicate that the absence of *gadC* affects the expression of several genes linked to glutamate metabolism under oxidative stress. The fact that expression of the *gadC* gene itself was significantly upregulated (approximately 10-fold) in the wild-type strain exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (not shown) supports the importance of the GadC transporter in oxidative stress defense.

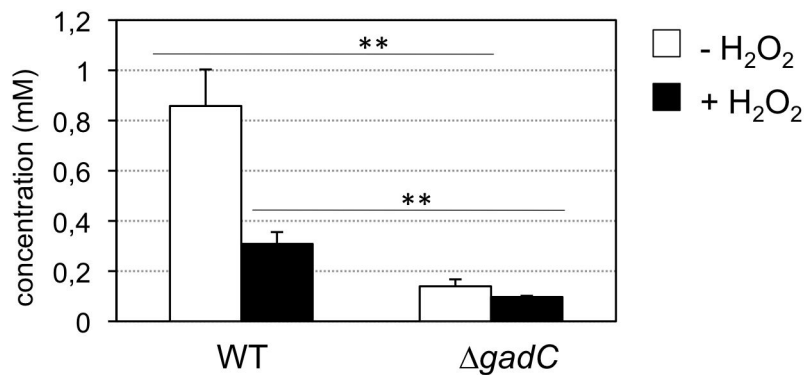
A

Signature	G-[LIV]-X-[LIVAST]-W-[LIVATM]-[RSKN]-[DKNQSH]-[AST]-[LIVM]-G-X(2)-[WFLIV]-[GA]-[FY]
Eco GadC	GVFAWVSNTLGPRWGF
Ftn GadC	GIYIWWKKA <sup>F</sup> GKRLGF

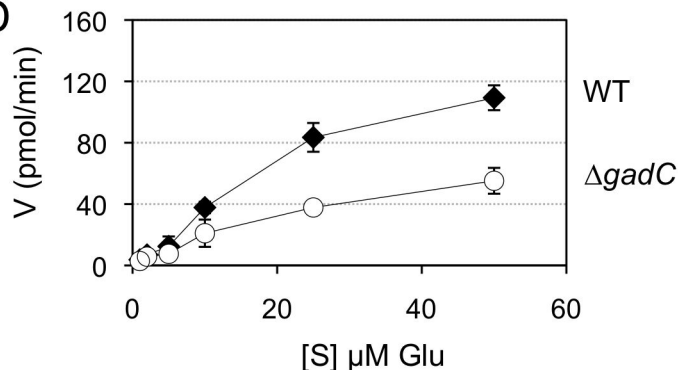
B



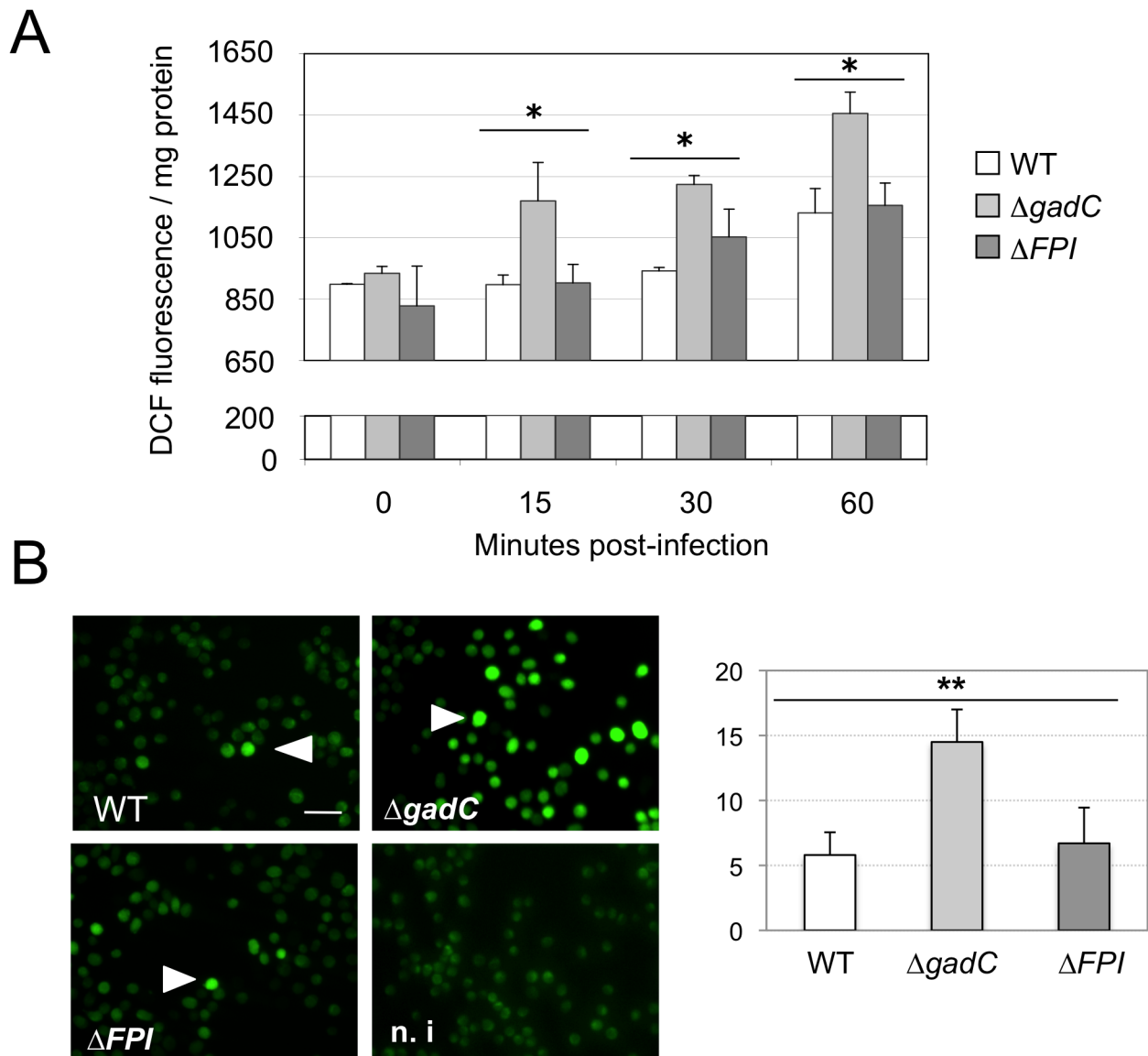
C



D



**Figure 4. GadC is a glutamic acid transporter.** (A) The signature sequence for the Glutamate/GABA subfamily of APC transporters is shown in the upper line. Middle line, sequence of the motif present in GadC of *E. coli*; lower line, sequence of the motif present in GadC of *Francisella* (in red the only residue diverging from the consensus). (B) Functional complementation of *E. coli gadC*. Acid resistance assays were performed on *E. coli* recombinant strains. Δ: *E. coli* strain bearing an inactivated *gadC* allele. WT: complemented strain bearing the wild-type *E. coli gadC* gene on plasmid pCF348 [49]. Comp -: complemented strain bearing the wild-type *Francisella gadC* gene carried on plasmid pCR2.1-Topo and Comp +: complemented strain bearing the wild-type *Francisella gadC* gene carried on plasmid pCR2.1-Topo and cultivated with IPTG. \*\* $p < 0.05$  as determined by the Student's *t*-test. (C) Intracellular glutamate detection and quantification was assayed on exponentially grown bacteria by HPLC analysis. Wild-type *F. novicida* and Δ*gadC* mutant strains were grown in CDM supplemented with 1.5 mM of glutamate, in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM). \*\* $p < 0.01$  (as determined by the Student's *t*-test). (D) Glutamate transport. Kinetics of <sup>14</sup>C-Glu uptake by wild-type *F. novicida* and Δ*gadC* mutant, at <sup>14</sup>C-Glu concentrations ranging from 1 μM to 50 μM. Bacteria grown to mid-exponential phase in CDM were tested. Uptake was measured after 5 min incubation with <sup>14</sup>C-Glu. Ordinate, pmol of glutamate taken up per min (per sample of app.  $2.5 \times 10^9$  bacteria). Abscissa, final concentrations of glutamate tested. doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g004

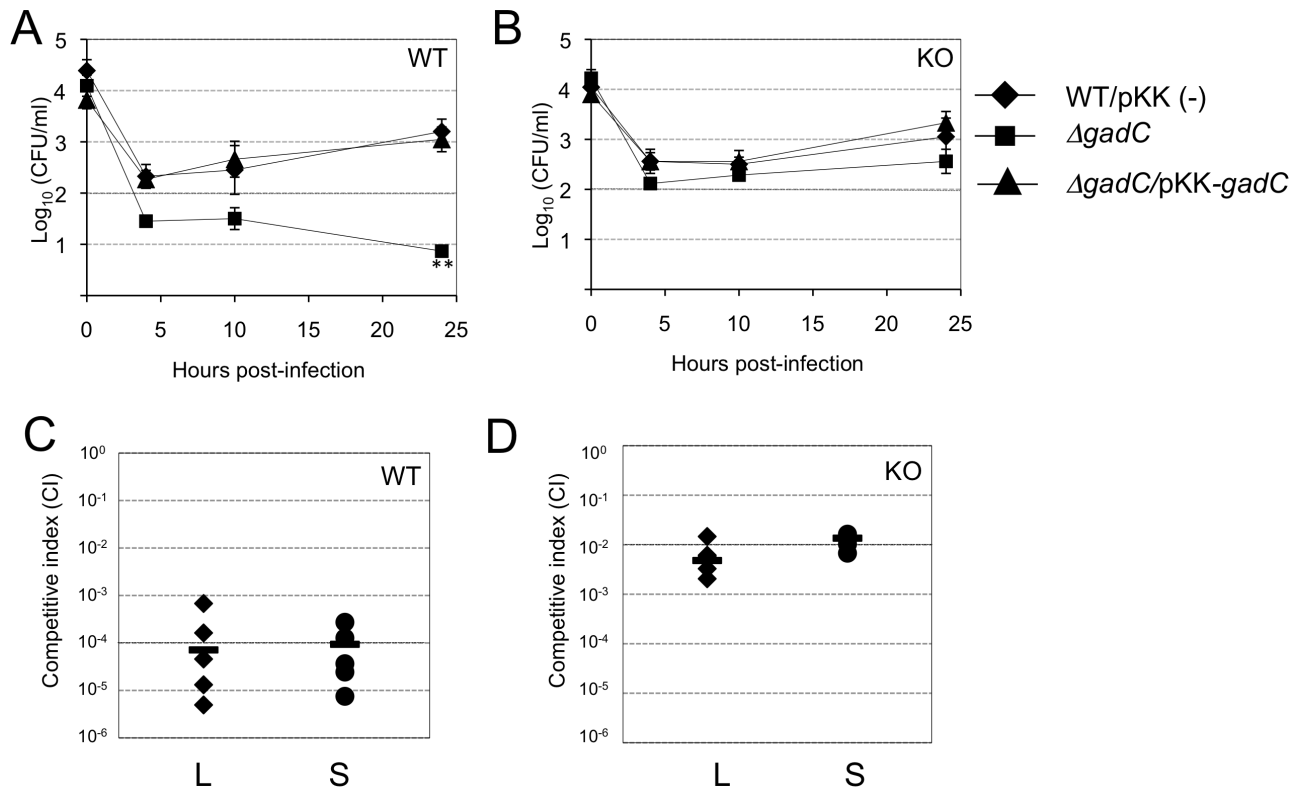


**Figure 5. ROS dosage in infected J774.1 cells. (A) ROS dosages.** Generation of ROS was measured by the  $H_2DCFDA$  assay in J774.1 cells infected with wild-type *F. novicida* (WT), the  $\Delta gadC$  or the  $\Delta FPI$  mutant strain. Results, normalized to the protein concentration in each well, are expressed per mg of total protein. The histogram is representative of three independent experiments. **(B) Fluorescence microscopy.** Left panel: DCFDA levels were also visualized using fluorescence microscopy. J774.1 cells were infected with wild-type (1),  $\Delta gadC$  (2) or  $\Delta FPI$  (3) bacteria. Non-infected J774.1 cells were used as negative control (4). White arrowheads indicate increased DCFDA levels. Scale bar is 50  $\mu m$ . Images represent fluorescence after 1 h of DCFDA treatment. Typical fields were chosen for illustration. Right panel: Quantification of the percentage of fluorescent J774.1 cells. At least 500 cells per experiment were scored for DCFDA labeling after 1 h of DCFDA treatment. Data are means  $\pm$  standard deviation from three independent assays.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g005

Direct quantification of TCA cycle intermediates present in the cytoplasm of the wild-type and  $\Delta gadC$  strains, by gas chromatography coupled with mass spectrometry (see Materials and methods for details), revealed that *gadC* inactivation significantly affected succinate, fumarate, and oxoglutarate contents (**Figure 7C**). Indeed, in the  $\Delta gadC$  mutant, the concentrations of succinate and fumarate were reduced *ca.* 60% as compared to the wild-type strain, whereas oxoglutarate was below the detection threshold of the assay. The concentrations of the three molecules increased up to 40% in the wild-type strain exposed to oxidative stress, suggesting an activation of the TCA under this condition. The concentrations of succinate and fumarate were not significantly

modified in the  $\Delta gadC$  mutant upon oxidative stress and oxoglutarate production was still below detection. The concentration of citrate was similar in the wild-type and the  $\Delta gadC$  mutant and did not vary upon oxidative stress, in any of the two strains. The intracellular concentrations of glutathione were also almost similar in the wild-type and  $\Delta gadC$  mutant (**Figure 7B**). Remarkably, under oxidative stress, the intracellular concentration of glutathione increased in both strains but only reached 65% of the level of the  $\Delta gadC$  mutant in the wild-type strain.

These observations prompted us to evaluate the impact of supplementation with different TCA cycle intermediates on survival of the  $\Delta gadC$  mutant in response to  $H_2O_2$  challenge.



**Figure 6. Intracellular survival and virulence in NADPH oxidase KO mice.** (A, B) Intracellular replication of wild-type *F. novicida* (carrying the empty plasmid pKK214 (WT/pKK(-)),  $\Delta\text{gadC}$  mutant and complemented strain ( $\Delta\text{gadC/pKK-gadC}$ ), and  $\Delta\text{FPI}$  mutant ( $\Delta\text{FPI}$ ), was monitored in BMM from either (A) C57BL/6J control mice (WT) or (B) phox-KO mice (homozygotes  $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ ; KO), over a 24-h period. Results are shown as the average of  $\text{log}_{10} \text{cfu mL}^{-1} \pm$  standard deviation. At all time points tested, the differences between the wild-type and  $\Delta\text{gadC}$  mutant values were not statistically different ( $p > 0.1$ , as determined by the Student's *t*-test). (C, D) Competition assays were performed by infecting intra-peritoneally: a group of five C57BL/6J control mice (WT, C); or a group of five phox-KO mice (KO, D), with a 1:1 mixture of wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{gadC}$  mutant strains (100 cfu of each). The data represent the competitive index (CI) value for cfu of mutant/wild-type in the liver (L: black diamonds, left column) and spleen (S: black circles, right column) of each mouse, 48 h after infection. Bars represent the geometric mean CI value. doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g006

For this, exponential phase wild-type and  $\Delta\text{gadC}$  mutant strains, diluted in CDM supplemented with glutamate, were subjected to oxidative stress, in the presence or absence of either fumarate, succinate or oxoglutarate (Figure S5). The sensitivity to  $\text{H}_2\text{O}_2$  of the  $\Delta\text{gadC}$  mutant was not modified neither by fumarate nor by oxoglutarate. In contrast, supplementation with succinate increased significantly the survival of the  $\Delta\text{gadC}$  mutant, to nearly wild-type level.

## Discussion

Intracellular pathogenic bacteria have adapted a variety of strategies and specific intracellular niches for survival and multiplication within their host [36]. Some reside in a vacuolar compartment whereas others have evolved to gain access to the host cytosol for multiplication. In mammalian host cells, *Francisella* intracellular replication occurs exclusively in the cytosolic compartment. We show here that inactivation of the GadC permease of *Francisella* prevents phagosomal escape, thus severely altering bacterial intracellular multiplication and virulence.

The data presented suggest that the GadC protein of *Francisella* is required to resist to the oxidative burst triggered by the NADPH oxidase in the phagosomal compartment of infected macrophages. We propose that GadC-mediated entry of glutamate contributes to fuel the tricarboxylic acid cycle and modulates the redox status of the bacterium. This work thus provides insights into the possible

links between oxidative stress resistance, metabolism, and bacterial intracellular parasitism.

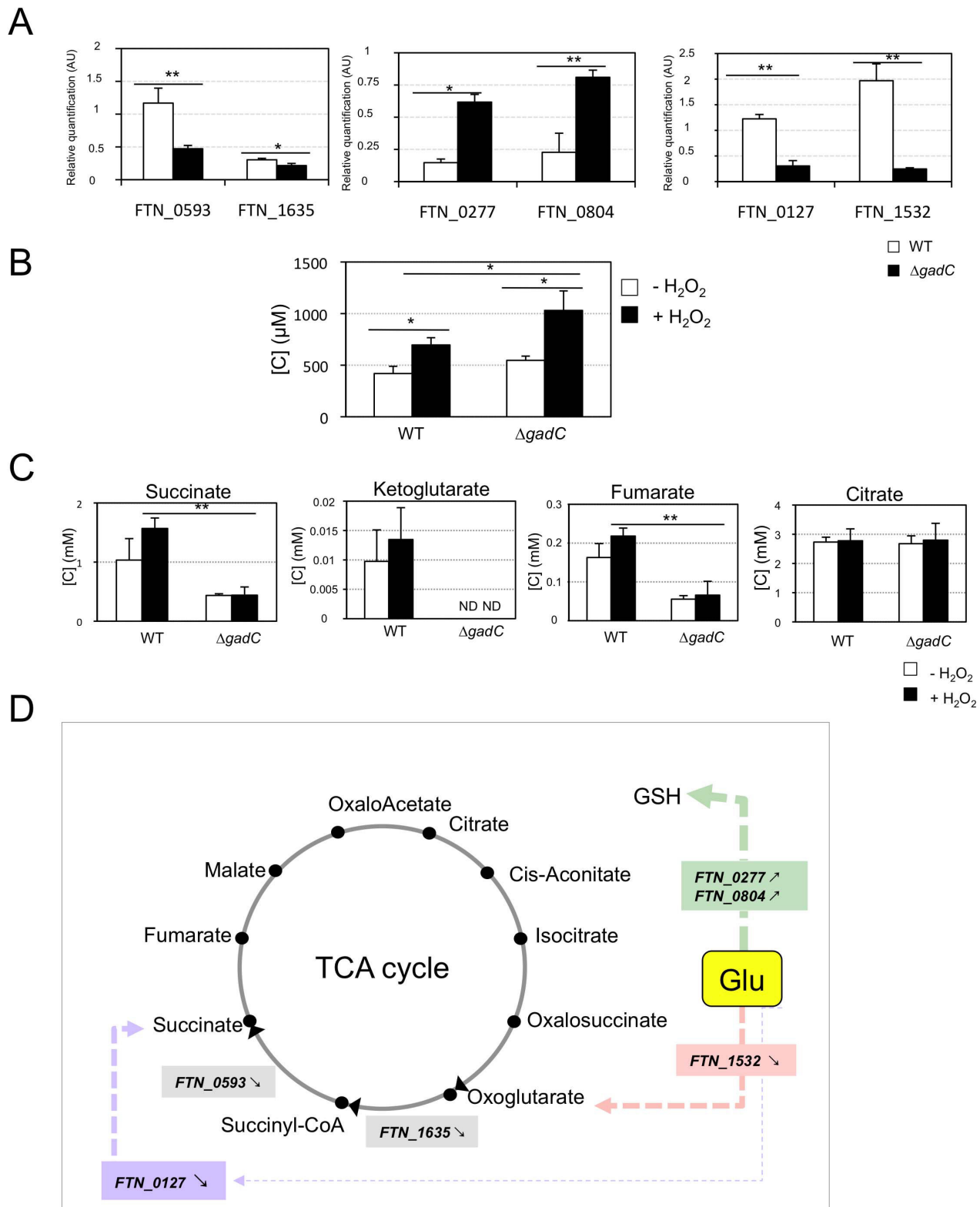
## GadC is involved in oxidative stress defense and required for phagosomal escape

Inactivation of *gadC* in *F. novicida* led to a severe growth defect in all cell types tested and *in vivo* assays further demonstrated the importance of GadC in *Francisella* virulence. Confocal and electron microscopy analyses revealed that the severe intracellular growth defect of the mutant was due to its inability to escape from the phagosomal compartment of infected macrophages.

Interestingly, most of the mutant bacteria that remained trapped within the phagosome were still alive for at least 10 h post-infection, indicating that impaired escape was not due to bacterial death. Since the  $\Delta\text{gadC}$  mutant showed increased susceptibility to oxidative stress in broth and failed to efficiently neutralize reactive oxygen species production in cells, it is likely that ROS may predominantly affect bacterial escape rather than survival.

*F. tularensis* produces enzymes that can metabolize and neutralize ROS, such as a superoxide dismutases (SodB, SodC), a catalase (KatG), a glutathione peroxidase and a peroxireductase [9,10]. Acid phosphatases have also been implicated in the resistance of intracellular *Francisella* to  $\text{H}_2\text{O}_2$  generated in the phagosomal compartment by the NADPH oxidase ([37,38] and





**Figure 7. Glutamate transport and metabolism.** (A) qRT-PCR of metabolic genes  $\pm H_2O_2$ . Bacteria were grown in TSB, in the absence or in the presence of  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ). qRT-PCR analyses were performed on selected genes, in wild-type *F. novicida* and in the  $\Delta gadC$  mutant. For each gene, the data are represented as the ratios of the value recorded under  $H_2O_2$  stress versus non-stress condition. Left panel: two genes encoding enzymes of the TCA cycle (*sucA*, FTN\_1635; *sucD*, FTN\_0593); middle panel: two genes encoding enzymes, converting glutamate (Glu) to glutathione (GSH) (*gshA*, FTN\_0277; *gshB*, FTN\_0804); right panel: two genes encoding enzymes, converting Glu to TCA cycle intermediates (*gdhA*, FTN\_1532; *gabD*, FTN\_0127). (B) Dosage of glutathione. The effect of oxidative stress on the cytoplasmic content of glutathione was evaluated in wild-type *F. novicida* and  $\Delta gadC$  mutant strains. Bacteria were cultivated for 30 min, with or without  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ), in CDM supplemented with glutamate

(1.5 mM). Reduced glutathione was quantified by HPLC analysis. Concentrations [C] are expressed in  $\mu\text{M}$ .  $*p < 0.05$  as determined by the Student's *t*-test. **(C) Dosage of TCA intermediates.** The effect of oxidative stress on the cytoplasmic contents of TCA cycle intermediates was monitored in wild-type *F. novicida* and  $\Delta\text{gadC}$  mutant strains. Bacteria were cultivated for 30 min, with or without  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ), in CDM supplemented with glutamate (1.5 mM). Succinate, fumarate, citrate and oxoglutarate, were quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Concentrations [C] are expressed in mM.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , as determined by the Student's *t*-test. **(D) Schematic representation of selected genes involved in glutamate metabolism.** The impact of *gadC* inactivation on the oxidative stress response of the target genes is indicated ( $\searrow$  means the ratio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated/non-treated) is lower in the mutant strain than in the wild-type strain;  $\nearrow$  the ratio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated/non-treated) is higher in the mutant strain than in the wild-type strain. In the absence of external glutamate (e.g. in standard chemically defined medium), the pool of glutamate present in the bacterial cytoplasm may be synthesized either from oxoglutarate, glutamine, GSH or even proline (according to KEGG metabolic pathways).

doi:10.1371/journal.ppat.1003893.g007

references therein). However, inactivation of the major phosphatase *acpA* in *F. tularensis* subsp. *tularensis*, had no impact on the activity of the NADPH oxidase in human neutrophils [5], thus confirming that other *Francisella* factors were involved in NADPH oxidase inhibition.

We show here that *Francisella* GadC is an important player specifically involved in oxidative stress defense. The existence of several paralogues of both the transporter GadC and the decarboxylase GadB in some bacterial species (for example in *L. monocytogenes*) might account for the fact that these have not yet been found to contribute to oxidative stress resistance and intracellular survival in standard genetic screens. Indeed, if functional paralogues exist, they must be simultaneously inactivated to observe a possible phenotypic defect. In addition, isofunctional antiporters with no significant amino acid sequence similarity to the GadC protein might exist in these bacteria.

The contribution of the GAD system to intracellular survival critically depends on the cellular compartment where bacterial survive and multiply. Indeed, bacteria residing in vacuolar compartments (such as *Salmonella*, *Mycobacteria*, *Legionella*, *Brucella* and *Chlamydia*) encounter different types of stresses (pH, oxidative, nutritional,...) than bacteria able to multiply in the host cell cytosol (such as *Francisella*, *Listeria*, *Shigella* and *Rickettsia*).

L-glutamate is very abundant in the intracellular compartment (reported concentrations vary between 2 and 20 mM) when compared to the extracellular compartment (app. 20  $\mu\text{M}$ ) [39]. Human macrophages have both the cystine/glutamate transporter and the Na-dependent high-affinity glutamate transporters (excitatory amino acid transporters, EAATs) that transport glutamate and aspartate. To maintain their intracellular pool of glutamate, macrophages may use either these transporters to import glutamate from the extracellular milieu or enzymatically convert cytosolic glutamine (via glutaminase) and aspartate (via aspartate transaminase) to glutamate. Glutamate might also be produced spontaneously intracellularly from pyroglutamate. Currently, nothing is known with respect to the content of glutamate in the phagosomal compartment. This might prove extremely difficult to establish, especially for pathogens such as *Francisella* or *Listeria* that reside only very transiently in this compartment.

A limited number of bacterial species have been shown to possess a GAD system [40]. These include *E. coli*, *Lactobacillus*, *L. monocytogenes* and *Shigella* species, in which the GAD system plays a major role in acid tolerance. It has been suggested that the GAD system is important for pathogenic microorganisms that, upon oral infection of mammalian hosts, need to survive the low pH of the stomach. However, some enteric pathogens like *Salmonella* do not possess a function GAD system and must thus rely on other anti-acidic pH strategies. Interestingly, the GAD system has been also found to contribute to oxidative stress defense in yeast and plant [41]. In bacteria, molecules such as the NADPH and NADH pools and glutathione (GSH), contribute to oxidative stress defense. Reduced GSH, present at mM concentrations, maintain a strong

reducing environment in the cell. Specific enzymes are also dedicated to control the levels of reactive oxygen species (ROS).

Remarkably, the  $\Delta\text{gadC}$  mutant was still outcompeted by wild-type bacteria in phox-KO mice. The different environments and the immune pressure, encountered by the bacterium during its systemic dissemination, are probably far more complex than in culture systems. *In vivo*, *Francisella* GadC is thus likely to contribute to other functions than combat ROS in the phagosomal compartment. It may, for instance, fulfill classical nutritional functions during bacterial cytosolic multiplication (in macrophages and/or in other infected non-phagocytic cells). Alternatively, GadC may be required during the bacterial blood stage multiplication and dissemination of the bacterium.

### A link between oxidative stress and bacterial metabolism

In *E. coli*, GABA produced by the glutamate decarboxylase is metabolized via the GABA shunt pathway. This leads to the production of succinate via the consecutive action of two enzymes: a GABA/oxoglutarate amino-transferase (GabT) that removes the amino group from GABA to form succinic semialdehyde (SSA) and Glu; and a succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD) that oxidises SSA to form succinate. Very recently, Karatzas and co-workers have shown [42] that *L. monocytogenes* also possessed functional GabT and GabD homologues that could provide a possible route for succinate biosynthesis in *L. monocytogenes*. The GABA shunt pathway, allowing the bypass of two enzymatic steps of the TCA (from oxoglutarate to succinate; **Figure 7 and S6**), is thought to play a role in glutamate metabolism, anaplerosis and antioxidant defense. However, its physiological role in pathogenesis is yet poorly understood. *Francisella* genomes possess a *gabD* orthologue but lack *gabT*. The GABA shunt pathway may therefore be non-functional in *Francisella*. Interestingly, the isogenic glutamate decarboxylase  $\Delta\text{gadB}$  mutant (**Figure S4**) that we constructed, showed a much less severe intracellular multiplication defect than the  $\Delta\text{gadC}$  mutant, and as well as no (or only a very mild) attenuation of virulence. If the glutamate imported via GadC would serve to produce GadB-mediated GABA, one would expect *gabB* inactivation to cause the same defect as *gadC* inactivation. As already mentioned in the Introduction, the *gabB* orthologue encodes a truncated protein in the subspecies *holarctica*. Altogether, these data support the notion that GadC and GadB of *Francisella* do not function in concert, unlike in several other bacterial species, and that GABA production plays a marginal role in *Francisella* pathogenesis. Further work will be required to understand the exact contribution of GadB in *Francisella* metabolism.

Our data indicate that GadC of *Francisella* encodes a genuine glutamate transporter involved in oxidative stress, unlike most other GadC orthologues described thus far. Glutamate can be converted in the bacterial cytoplasm into a number of compounds (**Figure 7**), such as glutamine, glutathione, GABA or the TCA cycle intermediate oxoglutarate. Oxoglutarate is known to be a potent anti-oxidant molecule that can be converted, in absence of



any enzymatic reaction, into succinate in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In addition, conversion of glutamate to oxoglutarate by the glutamate dehydrogenase GdhA increases the production of NADPH, which might also contribute to the anti-oxidant effect of glutamate acquisition.

Quantitative analyses of the intra-bacterial content of TCA cycle intermediates (**Figure 7B**) revealed a significant reduction of succinate and fumarate in the *gadC* mutant, as compared to wild-type *F. novicida*, and a striking decrease of oxoglutarate. These data support the notion that reduced entry of glutamate directly affects the production of these TCA cycle intermediates. In contrast, the amount of citrate remained unchanged in the mutant, suggesting refueling of the TCA cycle via other entry points (such as glycolysis or amino acid conversion).

Of note, mutants in genes *gdhA* (*FTN\_1533*) and *gabD* (*FTN\_0127*) were identified as required for replication in *D. melanogaster* S2 cells in a recent screen, supporting a role for these genes in intracellular bacterial survival [43]. The production and utilization of oxoglutarate by *Francisella* may thus constitute an efficient mean to modulate its cytoplasmic concentration of ROS.

In the absence of external glutamate, the pool of intracellular glutamate may be synthesized either from oxoglutarate, glutamine, GSH or even proline (according to KEGG metabolic pathways). Therefore, we evaluated the impact of *gadC* inactivation on the expression of genes involved in glutamate metabolism, under oxidative stress conditions. qRT-PCR analyses were performed in wild-type *F. novicida* and in the  $\Delta$ *gadC* mutant, grown in chemically defined medium containing glutamate, in the absence or in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figure 7A**). These assays revealed that *gadC* inactivation led to an important down-regulation of the genes involved the conversion of glutamate to oxoglutarate and succinate, upon oxidative stress (*FTN\_1532* and *FTN\_0127*, respectively). Conversely, *gadC* inactivation only moderately decreased the expression of *gshA* and *gshB*, the two genes involved in glutathione biosynthesis (*FTN\_0277* and *FTN\_0804*), upon oxidative stress whereas the expression of these genes was severely decreased in the wild-type strain.

These data are compatible with the notion that, under oxidative stress, the wild-type strain may favor the conversion of a fraction of its cytoplasmic pool of glutamate (neosynthesized and imported) to produce oxoglutarate and succinate rather than GSH. In contrast, when the cytosolic pool of glutamate is restricted to neosynthesized glutamate (*i.e.* in a *gadC* mutant or in a glutamate-depleted medium), the production of oxoglutarate and succinate may be decreased to favor that of other molecules (including GSH).

In conclusion, we identified a glutamate transporter as a novel *Francisella* virulence attribute that suggests links between the oxidative stress response and the TCA cycle during the early stage of the bacterial intracellular life cycle. The importance of the TCA cycle in the homeostasis of reactive oxygen species has just started to be considered in pathogenic bacterial species [12,44,45,46]. The development of specific inhibitors of transport systems involved in intracellular adaptation might constitute interesting anti-bacterial therapeutic targets.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with guidelines established by the French and European regulations for the care and use of laboratory animals (Decree 87–848, 2001–464, 2001–486 and 2001–131 and European Directive 2010/63/UE) and approved by the INSERM Ethics Committee (Authorization Number: 75-906).

### Bacterial strains, media, and chemicals

*F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) strain U112, its  $\Delta$ *FPI* derivative, and all the mutant strains constructed in this work, were grown as described in **Supplementary Material**. *E. coli* strains (kindly provided by John Foster, University of South Alabama, USA) were grown as described in **Supplementary Material**. All bacterial strains, plasmids, and primers used in this study are listed in **Supplemental Table 1**.

Details of the construction and characterization of mutant and complemented strains; macrophage preparation and infections, are described in **Supplementary Material**. Quantitative (q)RT-PCR (real-time PCR) was performed with gene-specific primers (**Supplemental Table 1**), using an ABI PRISM 7700 and SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

Electron and confocal microscopy complete descriptions; real time cell death and phagosome permeabilization assays, are described in **Supplementary Material**.

### Multiplication in macrophages

J774.1 macrophage-like cells (ATCC Number: TIB-67) were propagated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum, whereas human monocyte-like cell line THP-1 (ATCC Number: TIB-202) and bone marrow-derived macrophages (BMM) from BALB/c were propagated in RPMI Medium 1640 containing 10% fetal calf serum, respectively. J774.1 and BMM were seeded at a concentration of  $\sim 2 \times 10^5$  cells per well in 12-well cell tissue plates and monolayers were used 24 h after seeding. THP-1 were seeded at a concentration of  $\sim 2 \times 10^5$  cells per well in 12-well cell tissue plates 48 h before infection, and supplemented with phorbol myristate acetate (PMA) to induce cell differentiation (200 ng/ml). J774.1, BMM and THP-1 were incubated for 60 min at 37°C with the bacterial suspensions (approximately multiplicities of infection 100) to allow the bacteria to enter. After washing (time zero of the kinetic analysis), the cells were incubated in fresh culture medium containing gentamicin ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) to kill extracellular bacteria. At several time-points, cells were washed three times in DMEM or RPMI, macrophages were lysed by addition of water and the titer of viable bacteria released from the cells was determined by spreading preparations on Chocolate agar plates. For each strain and time in an experiment, the assay was performed in triplicate. Each experiment was independently repeated at least three times and the data presented originate from one typical experiment.

### Isolation of total RNA and reverse transcription

Bacteria were centrifuged for 2 min in a microcentrifuge at room temperature and the pellet was quickly re-suspended in Trizol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples were either processed immediately or frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Samples were treated with chloroform and the aqueous phase was used in the RNeasy Clean-up protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA) with an on-column DNase digestion of 30 min [47].

RNA Reverse transcription (RT)-PCR experiments were carried out with 500 ng of RNA and 2 pmol of specific reverse primers. After denaturation at  $65^\circ\text{C}$  for 5 min, 6  $\mu\text{L}$  of the mixture containing 4  $\mu\text{L}$  of  $5 \times$  first strand buffer and 2  $\mu\text{L}$  of 0,1 M DTT were added. Samples were incubated 2 min at  $42^\circ\text{C}$  and, then, 1  $\mu\text{L}$  of Superscript II RT (Thermo Scientific) was added. Samples were incubated for 50 min at  $42^\circ\text{C}$ , heated at  $70^\circ\text{C}$  for 15 min and chilled on ice. Samples were diluted with 180  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$  and stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

The following pair of primers was used to amplify the mRNA corresponding to the transcript of *FTN\_0570* (p13/p14),

*FTN\_0571* (p15/p16), *FTN\_1700* (p27/9p28), *FTN\_1701* (p29/p30), *FTN\_1702* (p31/p32), *FTN\_1532* (p33/p34), *FTN\_0127* (p35/p36), *FTN\_0277* (p37/p38), *FTN\_0804* (p39/p40), *FTN\_0593* (p41/p42), *FTN\_1434* (p43/p44) and *FTN\_1635* (p45/p46) (**Supplemental Table 1**).

### Quantitative real-time RT-PCR

Wild-type *F. novicida* and mutant strains were grown at 37°C from OD<sub>600</sub> ~0.1. After 4 h of incubation, samples were harvested and RNA was isolated. For oxidative stress tests, samples were cultivated 30 min more with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM). The 25 µL reaction consisted of 5 µL of cDNA template, 12.5 µL of Fastart SYBR Green Master (Roche Diagnostics), 2 µL of 10 µM of each primer and 3.5 µL of water. qRT-PCR was performed according manufacturer's protocol on Applied Biosystems - ABI PRISM 7700 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). To calculate the amount of gene-specific transcript, a standard curve was plotted for each primer set using a series of diluted genomic DNA from wild-type *F. novicida*. The amounts of each transcript were normalized to helicase rates (*FTN\_1594*).

### Oxidative and pH stress survival assays

Stationary-phase bacterial cultures were diluted at a final OD<sub>600</sub> of 0.1 in TSB broth or CDM with or without glutamate (1.5 mM final). Exponential-phase bacterial cultures were diluted to a final concentration of 10<sup>8</sup> bacteria mL<sup>-1</sup> and subjected to either 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or pH 5.5.

Oxidative stress response was also tested in CDM supplemented with glutamate, in the presence or absence of the TCA cycle intermediates: oxoglutarate, succinate or fumarate (1.5 mM final). The number of viable bacteria was determined by plating appropriate dilutions of bacterial cultures on Chocolate Polyvitex plates at the start of the experiment and after the indicated durations. Cultures (5 mL) were incubated at 37°C with rotation (100 rpm) and aliquots were removed at indicated times, serially diluted and plated immediately. Bacteria were enumerated after 48 h incubation at 37°C. Experiments were repeated independently at least twice and data represent the average of all experiments.

### Confocal experiments

J774.1 cells were infected with wild-type *F. novicida*, *AgadC* or *ΔFPI* strains for 1 h, 4 h and 10 h at 37°C, and were washed in KHM (110 mM potassium acetate, 20 mM Hepes, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Cells were incubated for 1 min with digitonin (50 µg/mL) to permeabilize membranes. Then cells were incubated for 15 min at 37°C with primary anti *F. novicida* mouse monoclonal antibody (1/500 final dilution, Immunoprecise). After washing, cells were incubated for 15 min at 37°C with secondary antibody (Ab) (Alexa Fluor 488-labeled GAM, 1/400 final dilution, Abcam) in the dark. After washing, cells were fixed with PFA 4% for 15 min at room temperature (RT) and incubated for 10 min at RT with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl to quench residual aldehydes. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with primary anti-LAMP1 Ab (1/100 final dilution, Abcam) in a mix with PBS, 0.1% saponine and 5% goat serum. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with secondary anti-rabbit Ab (alexa 546-labeled, 1/400 dilution, Abcam). DAPI was added (1/5,000 final dilution) for 1 min. After washing, the glass coverslips were mounted in Mowiol. Cells were examined using an X63 oil-immersion objective on a LeicaTSP SP5 confocal microscope. Colocalization tests were quantified by using Image J software; and mean numbers were calculated on more than 500 cells for each

condition. Confocal microscopy analyses were performed at the Cell Imaging Facility (Faculté de Médecine Necker Enfants-Malades).

### Electron microscopy

Infection of J774.1 cells was followed by thin section electron microscopy as previously described [48].

### Determination of intracellular bacterial viability

To evaluate the viability of *F. tularensis*, labelings were adapted to use the cell-impermeant nucleic acid dye propidium iodide (PI). J774.1 macrophage-like cells were seeded at 5.10<sup>5</sup> cells/ml on glass coverslips in 12-well bottom flat plates. Next day, cells were infected for 10 h with wild-type *F. novicida* or *AgadC* strain. After infection, cells were first permeabilized with digitonin for 1 min, washed three times with KHM and incubated for 12 min at 37°C with 2.6 µM PI (Life technologies, L7007) in KHM buffer to label compromised bacteria in permeabilized cells. Cells were washed three times with KHM and incubated for 15 min at 37°C with primary anti *F. novicida* mouse monoclonal antibody (1/500 final dilution). After washing, cells were incubated for 15 min at 37°C with secondary antibody (Ab) (Alexa Fluor 488-labeled GAM, 1/400 final dilution) in the dark. After washing, cells were fixed with PFA 4% for 15 min at room temperature (RT) and incubated for 10 min at RT with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl to quench residual aldehydes. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with primary anti-LAMP1 Ab (1/100 final dilution) in a mix with PBS, 0.1% saponine and 5% goat serum. After washing with PBS, cells were incubated for 30 min at RT with secondary anti-rabbit Ab (alexa 405-labeled, 1/400 dilution). After washing, the glass coverslips were mounted in Mowiol. Cells were examined using an X63 oil-immersion objective on a LeicaTSP SP5 confocal microscope. Analysis of cell fluorescence was performed with Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

### ROS detection assay

Intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by using the oxidation-sensitive fluorescent probe dye, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) as recommended by the manufacturer (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA, Molecular Probes, Eugene, OR). J774.1 cells were seeded at 5.10<sup>4</sup> cells/well. Cells were infected with bacteria for 15 min (MOI of 100:1), washed three times with PBS and incubated with H<sub>2</sub>DCF-DA diluted in PBS (concentration). DCF fluorescence was measured with the Victor<sup>2</sup> D fluorometer (Perkin-Elmer, Norwal, CT) with the use of excitation and emission wavelengths of 480 nm and 525 nm, respectively. Values were normalized by protein concentration in each well (Bradford). Samples were tested in triplicates in three experiments.

### Determination of ROS generation via fluorescent microscopy

J774.1 cells were seeded at 5.10<sup>4</sup> cells/well. Cells were infected with bacteria for 15 min (MOI of 1,000:1), washed three times with PBS and incubated with H<sub>2</sub>DCF-DA diluted in PBS for 1 h (5 µM). Images of the cells were captured with an Olympus CKX41 microscope and treated with Image J software. Cell counts were performed over 10 images of approximately 50 cells.

### Acid resistance assay

Acid resistance tests in *E. coli* were performed at pH 2.5 as described previously [49], by comparing the number of survival treated cells after 1 h of treatment over the number of cells at T0.

We compared survival of wild-type *E. coli* strain (WT) with *E. coli*  $\Delta$ *AgadC* ( $\Delta$ ) and *E. coli*  $\Delta$ *AgadC* complemented with the *F. novicida* *gadC* gene (PCR-amplified gene *FTN-0571* introduced into plasmid pCR2.1-Topo, in the correct orientation downstream of the *plac* promoter) (Comp). Acid challenge was performed by diluting 1:100 the overnight (22 h) culture in LB, supplemented (Comp +) or not (Comp -) with  $10^{-4}$  M final IPTG.

### Glutamate assays

Glutamate detection and quantification was done by using HPLC analysis. Wild-type *F. novicida* and  $\Delta$ *AgadC* strains were tested in CDM supplemented with 1.5 mM of glutamate, with or without  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ). For each condition, three independent cultures were prepared by overnight growth in CDM. The overnight cultures were diluted with 50 mL of fresh medium to  $\text{OD}_{600}$  of 0.05 and cultivated to an  $\text{OD}_{600}$  of app. 0.35. Bacteria were harvested by centrifugation at  $4,000 \times g$  for 20 min, resuspended in 25 mL of pre-warmed appropriated medium and cultivated for 30 min. For extracellular glutamate dosage, 100  $\mu\text{L}$  of each supernatant were resuspended with 400  $\mu\text{L}$  of cold methanol and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min. 20  $\mu\text{L}$  of each preparation were derivatized with 80  $\mu\text{L}$  of OPA. For intracellular dosage, each sample were resuspended in 600  $\mu\text{L}$  of cold methanol. The bacterial suspensions were sonicated thrice for 30 sec at 4.0 output, 70% pulsed (Branson Sonifier 250). Lysates were then centrifuged at  $3,300 \times g$  for 8 min, to remove debris.

Following steps were done with the standard procedure of Agilent using ZORBAX Eclipse AAA high as HPLC column. An amount equivalent to 2  $\mu\text{L}$  of each sample was injected on a Zorbax Eclipse-AAA column, 5  $\mu\text{m}$ ,  $150 \times 4.6$  mm (Agilent), at  $40^\circ\text{C}$ , with fluorescence detection. Aqueous mobile phase was 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , adjusted to pH 7.8 with NaOH, while organic mobile phase was acetonitrile/methanol/water (45/45/10 v/v/v). The separation was obtained at a flow rate of 2  $\text{mL min}^{-1}$  with a gradient program that allowed for 2 min at 0% B followed by a 16-min step that raised eluent B to 60%. Then washing at 100% B and equilibration at 0% B was performed in a total analysis time of 38 min. To evaluate glutamate concentration, glutamate standard curve was made in parallel.

### Glutathione assays

The procedure for the measurement of GSH was previously described [50]. Briefly, GSH were separated by HPLC, equipped with a Shimadzu Prominence solvent delivery system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), using a reverse-phase C18 Kromasil (5  $\mu\text{m}$ ;  $4.6 \times 250$  mm), obtained from AIT (Paris, Fr). The mobile phase for isocratic elution consisted of 25  $\text{mmol L}^{-1}$  monobasic sodium phosphate, 0.3  $\text{mmol L}^{-1}$  of the ion-pairing agent 1-octane sulfonic acid, 4% (v/v) acetonitrile, pH 2.7, adjusted with 85% phosphoric acid. The flow rate was 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Under these conditions, the separation of aminothiols was completed in 20 min. Deproteinized samples were injected directly onto the column using a Shimadzu autosampler (Shimadzu Corp.). Following HPLC separation, GSH was detected with a model 2465 electrochemical detector (Waters, MA, USA) equipped with a 2 mm Glassy carbon (GC) analytical cell and potential of +700 mV were applied.

### Glutamate transport assays

Cells were grown in Chamberlain medium to mid-exponential phase and then harvested by centrifugation and washed twice with Chamberlain without amino acid. The cells were suspended at a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.5 in the same medium containing 50 mg/ml of chloramphenicol. After 15 min of pre-incubation at  $25^\circ\text{C}$ , uptake

was started by the addition of L-[U- $^{14}\text{C}$ ] glutamic acid (Perkin Elmer), at various concentrations ( $^{14}\text{C}$ -Glu ranging from 1 to 50  $\mu\text{M}$ ). The radiolabeled  $^{14}\text{C}$ -Glu was at a specific activity of 9.25 GBq.mmol $^{-1}$ . Samples (100  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension) were removed after 5 min and collected by vacuum filtration on membrane filters (Millipore type HA, 25 mm, 0.22 mm) and rapidly washed with Chamberlain without amino acid (2  $\times$  5 mL). The filters were transferred to scintillation vials and counted in a Hidex 300 scintillation counter. The counts per minute (c.p.m.) were converted to picomoles of amino acid taken up per sample, using a standard derived by counting a known quantity of the same isotope under similar conditions.

### Quantification of TCA cycle intermediates

Succinate, fumarate, citrate and oxoglutarate were quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Wild-type *F. novicida* and  $\Delta$ *AgadC* strains were grown as for glutamate quantification. Briefly, after an overnight preculture in CDM, three independent cultures of wild-type and  $\Delta$ *AgadC* mutant were cultivated in 50 mL CDM to an  $\text{OD}_{600}$  of app. 0.35. Bacteria were harvested by centrifugation at  $4,000 \times g$  for 15 min, resuspended to the same  $\text{OD}_{600}$  in pre-warmed CDM supplemented with glutamate (1.5 mM) and cultivated for 30 min  $\pm$  500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Metabolite measurements were normalized by checking that each sample contained equal amounts of total proteins.

**Protein dosage.** After centrifugation at  $4,000 \times g$  for 20 min, each sample was resuspended in 2 mL of ice-cold 5 mM Tris.HCl (pH8). The bacterial suspensions were sonicated thrice for 30 sec at 4.0 output, 70% pulsed (Branson Sonifier 25). Lysates (three per strain per condition) were then centrifuged at  $3,300 \times g$  for 8 min, to remove debris. Protein concentration of the different samples was determined by the BCA assay (Pierce), following the manufacturer's recommendation. The values recorded for the wild-type and the  $\Delta$ *AgadC* mutant, in the absence or in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , were not significantly different ( $1,000 \text{ mg mL}^{-1} \pm 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $p$  value  $\geq 0.5$ ). The assay was repeated twice.

**Metabolite measurements.** After oxidative stress, bacterial samples were centrifuged at  $4,000 \times g$  for 20 min, resuspended in 600  $\mu\text{L}$  of cold methanol. The bacterial suspensions were sonicated thrice for 30 sec at 4.0 output, 70% pulsed (Branson Sonifier 250). Lysates were then centrifuged at  $3,300 \times g$  for 8 min, to remove debris. Then, samples were purified through SPE column (Strata-X, 30  $\text{mg mL}^{-1}$ , Phenomenex, California, USA). After elution, complete lyophilization and derivatization with methoxymation and silylation steps, 1  $\mu\text{L}$  of each sample were injected on GC column coupled to detection mass. Analyses were performed on Shimadzu GC2/MS-2010 (Columbia, MD). Data represent the average of three independent cultures for each condition.

### Virulence determination

Wild-type *F. novicida* and  $\Delta$ *AgadC* mutant strains were grown in TSB to exponential growth phase and diluted to the appropriate concentrations. 6 to 8-week-old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest St Isle, France) were intra-peritoneally (i.p.) inoculated with 200  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension. The actual number of viable bacteria in the inoculum was determined by plating appropriate dilutions of bacterial cultures on Chocolate Polyvitex plates. For competitive infections, wild-type *F. novicida* and mutant bacteria were mixed in 1:1 ratio and a total of 100 bacteria were used for infection of each of five mice. After two days, mice were sacrificed. Homogenized spleen and liver tissue from the five mice in one experiment were mixed, diluted and spread on to chocolate agar plates. Kanamycin selection to distinguish wild-type and mutant

bacteria were performed. Competitive index (CI) [(mutant output/WT output)/(mutant input/WT input)]. Statistical analysis for CI experiments was as described in [51]. Macrophage experiments were analyzed by using the Student's *t*-test.

## Supporting Information

**Figure S1 The *gadC* region. (A) Schematic organization.** The gene *gadC* (*FTN\_0571*, grey arrow) is flanked, upstream (83 bp) by gene *FTN\_0572* (transcribed on the opposite strand); and downstream, by gene *FTN\_0570* (white arrows), separated by a 101 bp intergenic region. **(B) Transcriptional analysis.** We performed rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) to determine the 5' end of the *gadC* mRNA. A broken arrow shows the transcription start of *gadC* (+1). Inspection of the sequence immediately upstream of the transcriptional start identified putative -10 and -35 promoter elements that share homology to the consensus site recognized by the major sigma factor  $\sigma^{70}$  [52]. The predicted  $\sigma^{70}$ -dependent -10 and -35 sequences are underlined. The predicted translation start codon of *gadC* is in bold italics. **(C) Quantitative real-time RT-PCR.** Quantification of *FTN\_0570* expression in *F. novicida* strain U112 (WT) or  $\Delta$ *gadC* mutant were performed in TSB at 37°C. qRT-PCRs were performed twice using independent samples (in triplicate). (TIFF)

**Figure S2 Growth kinetics in broth.** Stationary-phase bacterial cultures of wild-type *F. novicida* and  $\Delta$ *gadC* mutant strains were diluted to a final OD<sub>600</sub> of 0.1, in 20 mL broth. Every hour, the OD<sub>600</sub> of the culture was measured, during a 9 h-period. **(A)** CDM, chemically defined medium; **(B)** TSB, tryptic soy broth. (TIFF)

**Figure S3 Cell death.** The cell death kinetics of infected BMM (from BALB/c mice) was followed by monitoring propidium iodide (PI) incorporation in real time. PI fluorescence was measured every 15 min on a microplate fluorimeter (Tecan Infinite 1000). BMM were infected with wild-type *F. novicida*, (WT), the  $\Delta$ *gadC* mutant ( $\Delta$ *gadC*), or the  $\Delta$ *FPI* mutant ( $\Delta$ *FPI*). (TIFF)

**Figure S4 The decarboxylase mutant  $\Delta$ *gadB*.** **(A)** Intracellular replication of wild-type *F. novicida* carrying the empty plasmid pKK214 (WT/pKK(-)), of the mutant  $\Delta$ *gadB* and complemented strain ( $\Delta$ *gadB*/pKK-*gadB*), and of the  $\Delta$ *FPI* mutant ( $\Delta$ *FPI*), was monitored in J774.1 macrophage-like cells over a 24 h-period. Results are shown as the average of  $\log_{10}$  (cfu mL<sup>-1</sup>)  $\pm$  standard deviation. **(B)** Competition assays were performed by infecting a group of five female BALB/c mice by the i.p. route with a 1:1 mixture of wild-type bacteria and  $\Delta$ *gadB* mutant strain (100 cfu of each). The data represent the competitive index (CI) value for cfu of mutant/wild-type in the liver (L: black diamonds, left column) and spleen (S: black circles, right column) of each mouse, 48 h after infection. Bars represent the geometric mean CI value. (TIFF)

## References

- Sjostedt A, editor (2011) *Francisella tularensis* and tularemia: Fontiers Media SA.
- Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW (2004) Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nat Rev Microbiol 2: 967–978.
- Keim P, Johansson A, Wagner DM (2007) Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann N Y Acad Sci 1105: 30–66.
- Celli J, Zahrt TC (2013) Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med 3: a010314.
- McCaffrey RL, Schwartz JT, Lindemann SR, Moreland JG, Buchan BW, et al. (2010) Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. J Leukoc Biol 88: 791–805.
- Meibom KL, Charbit A (2010) The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. Curr Opin Microbiol 13: 11–17.
- Napier BA, Meyer L, Bina JE, Miller MA, Sjostedt A, et al. (2012) Link between intraphagosomal biotin and rapid phagosomal escape in *Francisella*. Proc Natl Acad Sci USA 109: 18084–18089.
- Melillo AA, Bakshi CS, Melendez JA (2010) *Francisella tularensis* antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production. J Biol Chem 285: 27553–27560.
- Lindgren H, Shen H, Zingmark C, Golovliov I, Conlan W, et al. (2007) Resistance of *Francisella* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. Infect Immun 75: 1303–1309.

**Figure S5 Oxidative stress response in the presence of the TCA cycle intermediates.** Exponential phase bacteria, diluted in chemically defined medium supplemented with 1.5 mM glutamate were subjected to oxidative stress (500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Upper panel:* in the presence or absence of fumarate (1.5 mM); *middle panel:* in the presence or absence of succinate (1.5 mM); *lower panel:* in the presence or absence of oxoglutarate (1.5 mM). The bacteria were plated on chocolate agar plates at different times and viable bacteria were monitored 2 days after. Data are the average cfu mL<sup>-1</sup> for three points. Experiments were realized twice. \*\*, *p* < 0.01 (as determined by the Student's *t*-test). (TIFF)

**Figure S6 Fate of GadC-dependent glutamate entry into *Francisella*.** External glutamate (Glu<sub>E</sub>) is taken up by the GadC permease. Internal Glutamate (Glu<sub>I</sub>) can be converted either to: i) glutamine by the glutamine synthase GlnA; ii) GABA by the glutamate decarboxylase GadD; ii) oxoglutarate (OG) by the glutamate dehydrogenase GdhA; or iii) glutathione (GSH) by the glutamate-cysteine ligase GshA and the glutathione synthetase GshB. Internal GABA may be either: i) translocated out of the cytoplasm, through GadC; or ii) converted to succinate (S), via the GABA shunt. The dotted green arrow indicates the alternative pathway leading (from Glu<sub>I</sub>) to glutathione production (GSH, reduced form, GSSG, oxidized form). The dotted red arrows indicate the two possible pathways leading to the tricarboxylic acid (TCA) cycle: i) from glutamate to oxoglutarate, or ii) from GABA to succinate. OA, oxaloacetate; C, citrate; A, cis-aconitate; IC, isocitrate; OS, oxalosuccinate; S-CoA, succinyl-CoA; F, fumarate; M, malate. The two anti-oxidant pathways (GshA/GshB in green; GdhA in pink) lead to the production of glutathione (GSH) and oxoglutarate (OG) + NADPH, respectively. They allow the oxidoreduction reactions: 2 GSH + ROOH  $\leftrightarrow$  GSSG + ROH + H<sub>2</sub>O; and NADPH + 2 O<sub>2</sub>  $\leftrightarrow$  NADP<sup>+</sup> + 2 O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>, respectively. (TIFF)

**Text S1 Supporting text.** This file includes one Table listing the strains, plasmids and primers used in this study (Table S1), Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References. (DOCX)

## Acknowledgments

We wish to thank the laboratory of Sebastian Amigorena (Institut Curie, Paris) for providing female p91 (phox) knockout mice (designated p91<sup>phox-/-</sup>) and wild-type control mice (designated p91<sup>phox+/+</sup>). We also thank Dr. JW Foster for providing the *E. coli* strains EF491 and EF547.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ER TH KM MB AC. Performed the experiments: ER GG MR JD MD ID. Analyzed the data: ER KM TH MB AC. Wrote the paper: ER AC.

10. Melillo AA, Mahawar M, Sellati TJ, Malik M, Metzger DW, et al. (2009) Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol* 191: 6447–6456.
11. Bakshi CS, Malik M, Regan K, Melendez JA, Metzger DW, et al. (2006) Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol* 188: 6443–6448.
12. Dieppedale J, Gesbert G, Ramond E, Chhuon C, Dubail I, et al. (2013) Possible links between stress defense and the tricarboxylic acid cycle in *Francisella* pathogenesis. *Mol Cell Proteomics* 12: 2278–2292.
13. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA (2004) Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* 72: 3204–3217.
14. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA (2009) *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun* 77: 1757–1773.
15. Santic M, Asare R, Skrobbonja I, Jones S, Abu Kwaik Y (2008) Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun* 76: 2671–2677.
16. De Biase D, Pennacchietti E (2012) Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon. *Mol Microbiol* 86(4):770–86.
17. Foster JW (2004) *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2: 898–907.
18. Karatzas KA, Brennan O, Heavin S, Morrissey J, O'Byrne CP (2010) Intracellular accumulation of high levels of gamma-aminobutyrate by *Listeria monocytogenes* 10403S in response to low pH: uncoupling of gamma-aminobutyrate synthesis from efflux in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* 76: 3529–3537.
19. Meibom KL, Charbit A (2010) *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol* 1: 140.
20. Gesbert G, Ramond E, Rigard M, Frapy E, Dupuis M, et al. (2013) Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella*. *Cell Microbiol* [epub ahead of print].
21. Maier TM, Casey MS, Becker RH, Dorsey CW, Glass EM, et al. (2007) Identification of *Francisella tularensis* Himar1-based transposon mutants defective for replication in macrophages. *Infect Immun* 75: 5376–5389.
22. Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, et al. (2007) *In vivo* negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6037–6042.
23. Peng K, Monack DM (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* 78: 2723–2733.
24. Kraemer PS, Mitchell A, Pelletier MR, Gallagher LA, Wasnick M, et al. (2009) Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice. *Infect Immun* 77: 232–244.
25. Ma D, Lu P, Yan C, Fan C, Yin P, et al. (2012) Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* 483: 632–636.
26. Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE (2003) Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett* 229: 195–202.
27. Chamberlain RE (1965) Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol* 13: 232–235.
28. Barel M, Meibom K, Charbit A (2010) Nucleolin, a shuttle protein promoting infection of human monocytes by *Francisella tularensis*. *PLoS One* 5: e14193.
29. Chong A, Wehrly T, Child R, Hansen B, Hwang S, et al. (2012) Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy* 8: 1342–1356.
30. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, et al. (2010) The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 11: 385–393.
31. Jones JW, Broz P, Monack DM (2011) Innate immune recognition of *Francisella tularensis*: activation of type-I interferons and the inflammasome. *Front Microbiol* 2: 16.
32. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, et al. (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11: 395–402.
33. Pierini R, Juruj C, Perret M, Jones CL, Mangeot P, et al. (2012) AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death Differ* 19: 1709–1721.
34. Jack DL, Paulsen IT, Saier MH (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146 (Pt 8): 1797–1814.
35. Takanashi T, Ogura Y, Taguchi H, Hashizoe M, Honda Y (1997) Fluorophotometric quantitation of oxidative stress in the retina in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2721–2728.
36. Kwaik YA, Bumann D (2013) Microbial Quest for Food in vivo: “Nutritional virulence” as an emerging paradigm. *Cell Microbiol* 15: 882–890.
37. Mohapatra NP, Soni S, Reilly TJ, Liu J, Klose KE, et al. (2008) Combined deletion of four *Francisella novicida* acid phosphatases attenuates virulence and macrophage vacuolar escape. *Infect Immun* 76: 3690–3699.
38. Mohapatra NP, Soni S, Rajaram MV, Strandberg KL, Gunn JS (2013) Type A *Francisella tularensis* Acid Phosphatases Contribute to Pathogenesis. *PLoS One* 8: e56834.
39. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R (2003) Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 21: 1–9.
40. Feehily C, Karatzas KA (2012) Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J Appl Microbiol* 114:11–24.
41. Cao J, Barbosa JM, Singh NK, Locy RD (2013) GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. *Yeast* 30: 129–144.
42. Karatzas KA, Suur L, O'Byrne CP (2012) Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 78: 3571–3579.
43. Asare R, Akimana C, Jones S, Abu Kwaik Y (2010) Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors. *Environ Microbiol* 12: 2587–2612.
44. Mailloux RJ, Beriault R, Lemire J, Singh R, Chenier DR, et al. (2007) The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One* 2: e690.
45. Eoh H, Rhee KY (2013) Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 6554–6559.
46. Richardson AR, Payne EC, Younger N, Karlinsey JE, Thomas VC, et al. (2011) Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Cell Host Microbe* 10: 33–43.
47. Thompson IJ, Merrell DS, Neilan BA, Mitchell H, Lee A, et al. (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* 71: 2643–2655.
48. Alkhuder K, Meibom KL, Dubail I, Dupuis M, Charbit A (2009) Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 5: e1000284.
49. Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181: 3525–3535.
50. Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS (2003) Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med* 35: 626–635.
51. Brotcke A, Weiss DS, Kim CC, Chain P, Malfatti S, et al. (2006) Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 74: 6642–6655.
52. Cowing DW, Bardwell JC, Craig EA, Woolford C, Hendrix RW, et al. (1985) Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 2679–2683.

**Annexe 3 : Possible links between stress defense and  
the tricarboxylic acid (TCA) cycle in *Francisella*  
pathogenesis.**

# Possible Links Between Stress Defense and the Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle in *Francisella* Pathogenesis\*

Jennifer Dieppedale‡§, Gael Gesbert‡§\*\*, Elodie Ramond‡§\*\*, Cerina Chhuon‡¶, Iharilalao Dubail‡§, Marion Dupuis‡§, Ida Chiara Guerrera‡¶, and Alain Charbit‡§||

*Francisella tularensis* is a highly infectious bacterium causing the zoonotic disease tularemia. *In vivo*, this facultative intracellular bacterium survives and replicates mainly in the cytoplasm of infected cells. We have recently identified a genetic locus, designated *moxR* that is important for stress resistance and intramacrophage survival of *F. tularensis*. In the present work, we used tandem affinity purification coupled to mass spectrometry to identify *in vivo* interacting partners of three proteins encoded by this locus: the MoxR-like ATPase (FTL\_0200), and two proteins containing motifs predicted to be involved in protein-protein interactions, bearing von Willebrand A (FTL\_0201) and tetratricopeptide (FTL\_0205) motifs. The three proteins were designated here for simplification, MoxR, VWA1, and TPR1, respectively. MoxR interacted with 31 proteins, including various enzymes. VWA1 interacted with fewer proteins, but these included the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase and TPR1. The protein TPR1 interacted with one hundred proteins, including the E1 and E2 subunits of both oxoglutarate and pyruvate dehydrogenase enzyme complexes, and their common E3 subunit. Remarkably, chromosomal deletion of either *moxR* or *tpr1* impaired pyruvate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase activities, supporting the hypothesis of a functional role for the interaction of MoxR and TPR1 with these complexes. Altogether, this work highlights possible links between stress resistance and metabolism in *F. tularensis* virulence. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 10.1074/mcp.M112.024794, 2278–2292, 2013.

*Francisella tularensis* is responsible for the disease tularemia in a large number of animal species. This highly infectious bacterial pathogen can be transmitted to humans in numerous ways (1, 2, 3), including direct contact with sick animals,

inhalation, ingestion of contaminated water or food, or by bites from ticks, mosquitoes, or flies. Four different subspecies (subsp.) of *F. tularensis* that differ in virulence and geographic distribution exist, designated subsp. *tularensis* (type A), subsp. *holarctica* (type B), subsp. *Novicida*, and subsp. *mediasiatica*, respectively. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies causing a severe disease in humans, whereas *F. tularensis* subsp. *holarctica* causes a similar disease but of less severity (4). Because of its high infectivity and lethality, *F. tularensis* is considered a potential bioterrorism agent (5).

*F. tularensis* is able to survive and to replicate in the cytoplasm of a variety of infected cells, including macrophages. To resist this stressful environment, the bacterium must have developed stress resistance mechanisms, most of which are not yet well characterized. We recently reported the identification of a novel genetic locus that is important for stress resistance and intracellular survival of *F. tularensis* (6). This locus was designated *moxR* because the first gene *FTL\_0200*, encodes a protein belonging to the AAA+ ATPase of the MoxR family ((7) and references therein). The data obtained in that first study had led us to suggest that the *F. tularensis* MoxR-like protein might constitute, in combination with other proteins of the locus, a chaperone complex contributing to *F. tularensis* pathogenesis.

To further validate this hypothesis and expand our initial observations, we here decided to perform tandem affinity purification (TAP),<sup>1</sup> using a dual affinity tag approach coupled to mass spectroscopy analyses (8), to identify proteins inter-

From the ‡Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Bâtiment Leriche, 96 rue Didot 75993 Paris Cedex 14 – France; §INSERM, U1002, Unité de Pathogénie des Infections Systémiques, Paris, France; ¶Plateau Protéome Necker, PPN, IFR94, Université Paris-Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, Paris 75015 France

Received October 9, 2012, and in revised form, May 1, 2013

Published, MCP Papers in Press, May 13, 2013, DOI 10.1074/mcp.M112.024794

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ACC, acetyl-CoA carboxylase; BACTH, bacterial two-hybrid; BCA, bicinchoninic acid; BMM, bone marrow derived macrophages; CBP, calmodulin binding protein; CDS, coding sequence; CFU, colony forming unit; CID, collision-induced dissociation; DSP, dithiobis(succinimidyl propionate); DTNB, 3,3'-dithio-bis(6-nitrobenzoic acid); IPTG, isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside; KEGG, Kyoto encyclopedia of genes and genomes; LTQ, linear trap quadrupole; LVS, live vaccine strain; OAA, oxaloacetate; OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; RP, reversed-phase; RPMI, Roswell park memorial institute medium; RSLC, rapid separation liquid chromatography; TAP, tandem affinity purification; TCA, tricarboxylic acid; TPP, thiamine pyrophosphate; TPR, tetratricopeptide; VWA, Von Willebrand type A factor.



acting *in vivo* with three proteins encoded by the proximal portion of the *moxR* locus. For this, we chose as baits: the MoxR-like protein (FTL\_0200) and two proteins bearing distinct motifs possibly involved in protein–protein interactions, FTL\_0201 (Von Willebrand Factor Type A domain, or VWA) and FTL\_0205 (tetratrichopeptide repeat or TPR). The three proteins were designated here for simplification, MoxR, VWA1, and TPR1; and the corresponding genes *moxR*, *vwa1*, and *tpr1*, respectively.

VWA domains are present in all three kingdoms of life. They consist of a  $\beta$ -sheet sandwiched by multiple  $\alpha$  helices. Frequently, VWA domain-containing proteins function in multi-protein complexes (9). TPR typically contain 34 amino acids. Many three-dimensional structures of TPR domains have been solved, revealing amphipathic helical structures (10). TPR-containing proteins are also found in all kingdoms of life. They can be involved in a variety of functions, and generally mediate protein–protein interactions. In the past few years, several TPR-related proteins have been shown to be involved in virulence mechanisms in pathogenic bacteria ((11) and references therein).

Our proteomic approach allowed us to identify a series of protein interactants for each of the three *moxR*-encoded proteins. Remarkably, the protein TPR1 interacted with all the subunits of the pyruvate dehydrogenase (PDH) and 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) complexes. Furthermore, inactivation of *tpr1* also severely impaired the activities of these two enzymes. Inactivation of *tpr1* affected bacterial resistance to several stresses (and in particular oxidative stress), intramacrophagic bacterial multiplication and bacterial virulence in the mouse model. Functional implications and possible relationship between bacterial metabolism, stress defense, and bacterial virulence are discussed.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Bacterial Strains and Plasmids**—*Francisella tularensis* LVS was grown on premade chocolate agar (BioMerieux SA Marcy l'Etoile, France), chocolate plates prepared from GC medium base, IsoVitalex vitamins, and hemoglobin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), or in Schaedler + vitamin K3 broth (Schaedler-K3, BioMerieux) at 37 °C. All bacterial strains, plasmids, and primers used in this study are listed in supplemental Table S1.

**Construction of a Chromosomal LVS $\Delta$ tpr1 Deletion Mutant**—The *F. tularensis* LVS $\Delta$ tpr1 deletion mutant was constructed using the same procedure as described previously (6). Briefly, we used the << suicide >> plasmid pPV an *E. coli*-*F. tularensis* shuttle vector (12), which possesses a *sacB* counter-selective gene, chloramphenicol and ampicillin selective genes, an *E. coli* replication origin (*ori pUC19*), and a transfer origin for conjugation (*oriT* RP4). The upstream and downstream regions of *tpr1* gene were amplified by overlapping PCR, and the resulting fragment was subcloned in the XbaI and SalI restriction sites of the plasmid pPV, yielding recombinant pPV- $\Delta$ tpr1. This plasmid was introduced in LVS by conjugation (6) and the chromosomal  $\Delta$ tpr1 deletion mutant was obtained by the classical two-step allelic replacement procedure (12).

**Functional Complementation**—Plasmids pFNLTP6pgro-*tpr1* and pFNLTP6pgro-*tpr1*-FTL\_0206 (here designated p6gro-*tpr1* and p6gro-*tpr1*-FTL\_0206) were used for complementation of LVS $\Delta$ tpr1.

Plasmid p6gro-*tpr1* was constructed by amplifying a 761 base pair (bp) fragment comprising the sequence 16 bp upstream of the *tpr1* start codon to 11 bp downstream of the stop codon. The primers used were Compl-FTL\_0205-FW and Compl-FTL\_0205-RV (supplemental Table S1). The plasmid p6gro-*tpr1*-FTL\_0206, was constructed by amplifying a 2508 bp fragment (corresponding to the sequence 100 bp upstream of the *tpr1* start codon and to 39 bp downstream of the stop codon of the FTL\_0206 gene) using primers Compl-FTL\_205/206-FW EcoRI and Compl-FTL\_205/206-RV BamHI (supplemental Table S1), followed by digestion with EcoRI and BamHI, and cloning into plasmid pFNLTP6pgro (p6gro) (13). The amplified product was digested with BamHI and EcoRI and cloned into the corresponding sites of plasmid p6gro.

The plasmids p6gro (plasmid without insert), p6gro-*tpr1* and p6gro-*tpr1*-FTL\_0206 (the complementing plasmids) were introduced into LVS or LVS $\Delta$ tpr1 mutant strain by electroporation, as described previously (6).

**Construction of Strains Expressing TAP-tagged Proteins**—The *moxR*, *vwa1* and *tpr1* genes were amplified from genomic DNA of LVS, using the appropriate pairs of primers (supplemental Table S1). The amplified fragments were cloned into the expression vector p6gro, resulting in the following plasmids: p6gro-*moxR*, p6gro-*vwa1*, p6gro-*tpr1*. The tandem affinity purification tag (TAPtag) sequence was amplified from plasmid pEB304 (8, 14), using primers 7 or 8, and 9 (supplemental Table S1). This TAP tag sequence (composed of the sequence of protein A, a TEV protease cleavage site, and the calmodulin binding domain) was fused in frame, in the NotI or XhoI restriction sites, after the last codon of each coding sequence) to the C-terminal end of each gene (in p6gro recombinant plasmids). The resulting plasmids were finally introduced in the LVS strain by electroporation, yielding the recombinant strains LVS/p6gro-*moxR*-TAP, LVS/p6gro-*vwa1*-TAP, and LVS/p6gro-*tpr1*-TAP, respectively. The tagged proteins were designated MoxR-TAP, VWA1-TAP, and TPR1-TAP, respectively. The p6gro-*moxR*-TAP plasmid was also introduced in the mutant strain LVS $\Delta$ tpr1 to verify the activity of protein TPR1-TAP by functional complementation.

**Purification of TAP-tagged Proteins from *F. tularensis* LVS**—*F. tularensis* cells of logarithmic phase (2 liters of culture at an OD<sub>600</sub> of 0.5–0.7) were harvested (3000  $\times$  g for 20 min) and resuspended in 20 ml of a solubilization buffer consisting of 100 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 100 mM KCl, 8% glycerol and complete protease inhibitor mixture, Roche (one tablet for 50 ml of buffer). Then, cells were harvested (3000  $\times$  g for 30 min) and resuspended in 10 ml of solubilization buffer. The cross-linker dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP) (G-Biosciences) was added at a concentration of 20 mg/ml for 5 min on ice, and the cross-link reaction was stopped by addition of 1 mM Tris/HCl pH 7.4 (15). The bacterial suspension was sonicated 20 times for 30 s at 4.0 output, 70% pulsed (Branson Sonifier 250). After centrifugation of cell debris (16,000  $\times$  g for 30 min), 0.1% Nonidet P-40 was added to the protein lysate. Then, the protein extracts were incubated for 2 h at 4 °C, with 0.5 ml of Sepharose-IgG beads (GE Healthcare), previously washed with binding buffer (100 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 100 mM KCl, 8% glycerol, 0.1% Nonidet P-40). The column was washed three times with binding buffer. The bound proteins were recovered by addition of 1 ml (four times with 250  $\mu$ l) of 100 mM glycine-HCl at pH 3, supplemented with 100 mM KCl. The eluate was added to three volumes of Calmodulin binding buffer (binding buffer supplemented with 4 mM CaCl<sub>2</sub>) and the pH was readjusted to 7 by addition of KOH before binding to the calmodulin beads. Then, this protein eluate was incubated at 4 °C for 1 h with 0.5 ml of Sepharose-calmodulin beads (GE Healthcare), previously washed with calmodulin binding buffer. After, the column was washed three times with this same buffer and the protein complex was eluted with 1 ml (five times with 200  $\mu$ l) of 20 mM Tris/HCl pH 8,



containing 50 mM NaCl, 5 mM EGTA. Purified proteins were washed with PBS 1X and concentrated, using microcons 10,000 MWCO (Amicon, Millipore). Proteins were quantified with BCA assay kit (Pierce, Thermo Scientific).

**Western Blot Analysis**—The TAP-tagged proteins were detected by Western blot using ECL™ Western blot Detection Reagents (GE Healthcare) and anti-TAPtag antibodies (Genscript), according to the manufacturer's recommendations. The primary rabbit anti-TAPtag antibody was used at a final dilution of 1:1000 in PBS Tween 0.05%, 5% milk (PBS-TM), and incubated for 1 h. The secondary anti-rabbit antibody was used at a final dilution of 1:2000 in PBS-TM and incubated for 1 h.

**Bacterial Two-Hybrid (BACTH) Complementation Assays**—The LVS genes were amplified from genomic DNA, using the appropriate pairs of primers (supplemental Table S1). These genes were fused in-frame to the DNA sequences encoding the T18 or T25 domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. The gene *moxR* was cloned into pKT25 vector (C-terminal fusion to T25 domain), and the gene *tp1* was cloned into pKT25 and pKNT25 vectors (yielding C-terminal and N-terminal fusions to T25, respectively) (16). The genes *FTL\_1783*, *FTL\_0309*, *FTL\_0310*, *FTL\_0311*, and *FTL\_0295*, were cloned into pUT18C vector (C-terminal fusion to T18 domain). The different pairs of recombinant plasmids (pKT25-x/pUT18C-y or pKNT25-x/pUT18C-y) were used to cotransform *E. coli* strain BTH101.

The transformants were selected onto LB plates containing 40 µg/ml X-Gal, 0.5 mM IPTG, 50 µg/ml Kanamycin and 100 µg/ml Ampicillin, and incubated at 30 °C for 24 to 36 h. As negative control, BTH101 cells were co-transformed with empty pUT18C vector and pKT25 vector containing either *moxR* gene or *tp1* gene (or pKNT25 vector containing *tp1* gene). Each BACTH assay was performed twice.

**Enzymatic Assays**—LVS, LVSΔ*moxR*, and LVSΔ*tp1* strains were grown until exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.5–0.7). The cells (15 ml) were harvested by centrifugation at 3000 × *g* for 20 min and resuspended in 2 ml of 5 mM Tris-HCl pH 8. The bacterial suspensions were sonicated four times for 30 s at 4.0 output, 70% pulsed (Branson Sonifier 250). Oxoglutarate and pyruvate dehydrogenase activities were assayed by measuring the reduction of NAD<sup>+</sup> at 340 nm upon the addition of 0.5 mM NAD<sup>+</sup>, 200 µM TPP, 40 µM CoASH, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 9 mM L-cysteine and either 16 mM oxoglutarate (α-keto-glutarate) or 16 mM pyruvate to 20 µg ml<sup>-1</sup> *F. tularensis* cell lysate, as described in (17, 18). Protein concentration was estimated with BCA assay kit (Pierce, Thermo Scientific). Assays were performed in a final volume of 1 ml.

Assays for the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase were performed at 412 nm in the reverse direction in which malonyl-CoA reacts with biocytin to form acetyl-CoA and carboxybiotin. The production of acetyl-CoA was coupled to citrate synthase, which produced citrate and coenzyme A. The amount of coenzyme A formed was detected using 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), as described in (19).

The assay buffer consisted of 100 mM potassium phosphate (pH 7.6) with 0.1% Tween 20. Final concentrations of reagents in the assay were as follows: 200 mM malonyl-CoA, 12 mM biocytin, 10 mM oxaloacetate, 200 mM DTNB, 104 nM citrate synthase, and 50 µg of total protein. The assay was realized in a final volume of 100 µl in 96-well plates, with a classic plate reader (Multiskan RC, ThermoLabsystems).

Catalase activity assay was realized using the Amplitude™ Fluorimetric Catalase Assay Kit (AAT Bioquest Inc® CA, USA). The assay was performed according to manufacturer's recommendation. Briefly, the samples (50 µl containing 0.04 µg of total proteins) were incubated with 50 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing assay buffer, at room temperature for

30 min. Then, the catalase assay mixture (containing Amplitude™ Red substrate and Horseradish peroxidase) was added and the incubation pursued for another 30 min. Therefore, the reduction in fluorescence intensity is proportional to catalase activity. The fluorescence of the final mixture was then determined on a BioRad iMark™ absorbance microplate reader at 576 nm.

**Growth Kinetics in Broth and Stress Survival Assays**—Stationary-phase bacterial cultures of LVS/p6gro, LVSΔ*tp1*/p6gro and LVSΔ*tp1*/p6gro-*tp1* mutant strains were diluted at a final OD<sub>600</sub> of 0.1 in Schaedler-K3 broth. Exponential-phase bacterial cultures were diluted to a final concentration of 10<sup>8</sup> bacteria/ml and subjected to the following stress conditions: 10% ethanol, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4.0, 50 °C or 0.05% SDS. The number of viable bacteria was determined by plating appropriate dilutions of bacterial cultures on Chocolate Polyvitex plates at the start of the experiment and after the indicated durations. For experiments at 50 °C, aliquots of 0.25 ml in a 1.5 ml tube were placed at 50 °C statically and at the indicated times, the tubes were placed on ice, serially diluted, and plated. For experiments with ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 4.0 or 0.05% SDS, cultures (5 ml) were incubated at 37 °C with rotation (100 r.p.m.) and aliquots were removed at indicated times, serially diluted and plated immediately. Bacteria were enumerated after 72 h incubation at 37 °C. Experiments were repeated independently at least twice and data represent the average of all experiments.

**Multiplication in Macrophages**—Intracellular multiplication assays were performed essentially as previously described (6). THP1 (ATCC Number: TIB-202™) cells were propagated in RPMI containing 5% fetal calf serum. Cells were seeded at a concentration of ~2 × 10<sup>5</sup> cells per well in 12-well cell tissue plates and monolayers were used 48 h after seeding. THP-1 cells were differentiated by treatment, with 200 ng ml<sup>-1</sup> phorbol myristate acetate (PMA). THP1 macrophage monolayers were incubated for 60 min at 37 °C with the bacterial suspensions (multiplicities of infection 100) to allow the bacteria to enter. After washing (time zero of the kinetic analysis), the cells were incubated in fresh culture medium containing gentamicin (10 µg ml<sup>-1</sup>) to kill extracellular bacteria. At several time-points, cells were washed three times in RPMI, macrophages were lysed by addition of water and the titer of viable bacteria released from the cells was determined by spreading preparations on Chocolate agar plates. For each strain and time in an experiment, the assay was performed in triplicate. Each experiment was independently repeated at least three times and the data presented originate from one typical experiment.

**Mice Virulence Assay**—All animal experiments were carried out in accordance to the European guidelines and following the recommendations of the INSERM guidelines for laboratory animal husbandry. LVS/p6gro, LVSΔ*tp1*/p6gro and LVSΔ*tp1*/p6gro-*tp1*-*FTL\_0206* strains were grown in Schaedler-K3 containing kanamycin to exponential growth phase and diluted to the appropriate concentration. six to 8 weeks old female BALB/c mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were injected each day subcutaneously with kanamycin (50 µl of 12 mg ml<sup>-1</sup> solution) 1 day before and every day during the infection. Mice were intraperitoneally inoculated with 200 µl of bacterial suspension (corresponding to ~250 CFU). The actual number of viable bacteria in the inoculum was determined by plating dilutions of the bacterial suspension on chocolate plates. After 4 days, the mice were sacrificed. Homogenized spleen and liver tissue from the five mice were diluted and spread onto chocolate agar plates supplemented with kanamycin and the number of viable bacteria per organ determined.

**Identification of Proteins by Mass Spectrometry**—Protein samples were run on SDS-PAGE gels and silver stained (20). Gel lanes were excised and subjected to tryptic digestion with sequencing grade modified Trypsin (Promega), as described previously (15). Nano-LC-MS/MS analysis of in-gel digested samples was performed on an

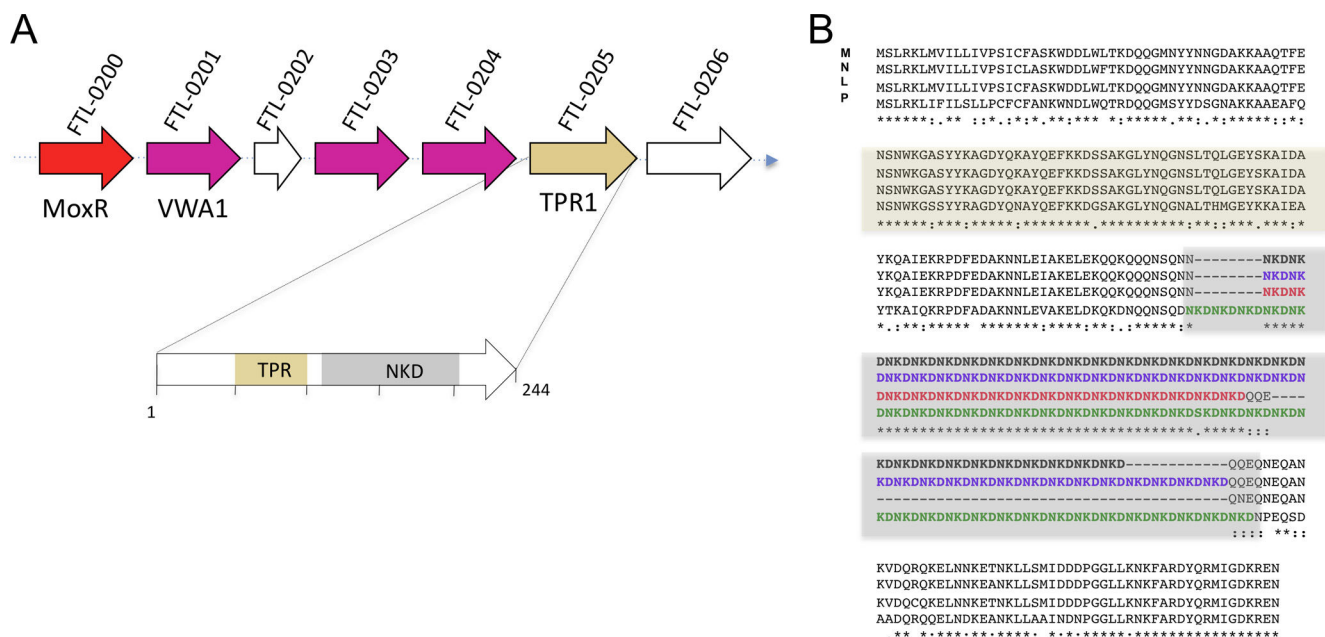


FIG. 1. Sequence analysis of protein TPR1. A, Upper line. Schematic organization of the proximal region of the *moxR* locus (genes *FTL\_0200*-*FTL\_0206*). Gene *moxR* (*FTL\_0200*), encoding the MoxR protein is colored in red. The three genes encoding proteins containing VWA motifs are in magenta. Gene *vwa1* (*FTL\_0201*) encodes the VWA1 protein. Gene *tpr1* (*FTL\_0205*), encoding the protein TPR1 (containing the TPR motif), is in beige. Lower line. Schematic representation of the regions of the tetratricopeptide repeats (TPR), residues 31–130 (e value  $5.7 \times 10^{-15}$ ) and of the NKD repeats (region of residues 138–186). B, ClustalW 2.1 multiple sequence alignments of selected orthologues of TPR1. M, *F. tularensis* susp. *mediasiatica*; N, *F. tularensis* susp. *novicida*; L, *F. tularensis* susp. *holarctica*; P, *F. philomiragia*. The orthologues of TPR1 contain variable numbers of NKD repeats: 28 in *F. tularensis* susp. *mediasiatica* (in bold black, FTM\_1557); 32 in *F. tularensis* susp. *novicida* (in bold blue, FTM\_0209); and 36 in *F. philomiragia* (in bold green, Fphi\_0623), respectively.

Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) system (Dionex) coupled to LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). Extracted peptides were dissolved in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, 10% acetonitrile, and pre-concentrated on a 75  $\mu$ m i.d. reversed-phase (RP) trapping column and separated with an aqueous-organic gradient (solution “A”: 0.1% (v/v) formic acid in 5% (v/v) acetonitrile; solution “B”: 0.085% (v/v) formic acid in 80% (v/v) acetonitrile; flow rate 400 nL/min) on a 75  $\mu$ m i.d. RP column (Acclaim PepMap RSLC 75  $\mu$ m  $\times$  15 cm, 2  $\mu$ m, 100Å, Dionex). Elution gradient settings for standard protein samples were: 3 min at 0% B, 10 min from 0% B to 10% B, 7 min from 10% B to 20% B, 7 min from 20% B to 40% B, 4 min from 40% B to 50% B, 0.5 min from 50% B to 90% B, 5 min at 90% B, 0.5 min from 90% B to 0% B, 5 min at 0%. MS instrument settings were as follows: spray voltage 1.8 kV; capillary temperature 250 °C; FT full MS target 1,000,000 (maximum injection time 500 ms); IT MSn target 5000 (maximum injection time 100 ms). 2 FTMS full scan were averaged (resolution 30,000 for LTQ-Orbitrap velos; positive polarity; centroid data; scan range 400 to 2000 *m/z*) and the 20 most intense signals were subjected to MS/MS in the collision-induced dissociation (CID) cell (resolution 15,000; centroid data) with dynamic exclusion (repeat count 1; exclusion list size 500; repeat/exclusion duration 12 s; exclusion mass width  $\pm$  10 ppm), preview mode for FTMS master scans, charge state screening, monoisotopic precursor selection and charge state rejection (charge state 1 and 4+) enabled. Activation type was CID with default settings.

LC-MS/MS data were extracted and raw files from the analysis of bands from each independent experiment were merged. For data analysis, peak lists were generated by Proteome Discoverer v1.2 (Thermo Scientific) and searched against all the concatenated sequences of all the subspecies of *F. tularensis* (14,148 sequences; available online on <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=>

complete%3Ayes+content%3Afrancisella+tularensis&sort = score) from UniProtKB/Swiss-Prot complete proteome database (release 2011\_01; 524,420 sequences) using the Mascot search engine (version 2.2.07; Matrix Science).

Default parameters used were: fixed modification (Carbamidomethyl (C)), and variable modification (Oxidation (M)) were allowed as well as one missed cleavage. Enzyme was trypsin, monoisotopic peptide mass tolerance was  $\pm$  5 ppm (after linear recalibration), fragment mass tolerance was  $\pm$  0.5 Da, false discovery rate was lower than 2%. Only proteins identified with at least two unique peptides and with the ion score higher than 25 were retained.

## RESULTS

**In Silico Analyses**—We have recently identified a genetic locus, conserved among *Francisella* genomes, that comprises ten consecutive genes in the same orientation (*FTL\_0200* to *FTL\_0209*, in *F. tularensis* LVS). Deletion of gene *moxR* (*FTL\_0200*) led to a mutant bacterium with increased vulnerability to various stress conditions and a growth defect in infected macrophages (6). Remarkably, the proximal part of the *moxR* operon, which is conserved in the genomes of several other pathogenic bacterial species, encodes proteins containing either tetratricopeptide repetition (TPR) or von Willebrand type A (VWA) motifs (Fig. 1). Confirming the peculiar characteristics of this genetic region, we identified only a limited number of proteins bearing either TPR or VWA motifs in the *F. tularensis* genomes currently available in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, us-

ing the Superfamily prediction program (available at <http://supfam.cs.bris.ac.uk>). Indeed, FTL\_0201 (here designated VWA1), FTL\_0203 and FTL\_0204, were the only three proteins predicted to contain VWA-like motifs; and four proteins, including FTL\_0205 (here designated TPR1), were predicted to contain TPR motifs with significant hits.

We identified a multiple 9 bp repeat in the middle part of gene *tpr1* (FTL\_0205), accounting for the presence of a NKD tripeptide repeat in the central part of the TPR1 protein (Fig. 1). The presence of 25 regions of 9 bp repeats (designated SSTR9 for short sequence tandem repeat with 9 nucleotides) had been previously reported in the genome of *F. tularensis* SCHU S4 (21). Twelve of these repeats were identified within predicted open reading frames, one of which corresponds to the ortholog of *tpr1*. Multiple amino acid sequence alignments reveals that the number of repetitions of the NKD motif varies among the different TPR1 protein homologs *i.e.* 32 repeats in *F. tularensis* subsp. *novicida* and 36 repeats in *Francisella philomiragia* ortholog (as compared with 16 repeats in TPR1 of LVS) (Fig. 1A). Hence, the protein TPR1 contains both a TPR motif in its proximal part and a NKD repeat region in its central part, suggesting unique structural properties for this protein (Fig. 1B).

In *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, a careful re-examination of the gene designated FTT\_0294, which corresponds to the two distinct genes FTL\_0204 and FTL\_0205 in LVS, revealed it was erroneously annotated as a pseudogene in the KEGG database. In fact, the DNA sequence of FTT\_0294 encompasses two consecutive coding sequences with a 10 bp overlap (supplemental Fig. S1A). The proximal part of FTT\_0294 encodes a protein sharing 99.7% identity with FTL\_0204 and the distal part of FTT\_0294, a protein sharing 84.1% identity with FTL\_0205 (TPR1) (supplemental Fig. S1B).

**Identification of In Vivo Interaction Partners**—Tandem affinity purification (TAP) was used to identify proteins interacting *in vivo* with proteins of the *moxR* locus, using a dual affinity tag coupled to mass spectrometry (8). We focused in the present work on MoxR, and on one protein for each type of protein–protein interaction motif. Our working hypothesis was that the interactomes of these baits would lead to the identification of other *moxR*-encoded proteins. VWA1 was chosen as a prototypic VWA-bearing motif protein because gene *vwa1* was the only gene (of the three genes encoding VWA-bearing proteins), to be significantly up-regulated upon infection of macrophages (22). We thus considered that it was the most relevant candidate to identify interacting partners possibly involved in *Francisella* intracellular survival and virulence. TPR1 was chosen because it was the only protein of the *moxR* locus to bear a TPR motif and the only TPR protein encoded by the *Francisella* genome that also carried a NKD tripeptide repeat.

The three TAP-tagged proteins constructed were designated MoxR-TAP, VWA1-TAP and TPR1-TAP, respectively

(see Experimental procedures for details). The corresponding recombinant genes were expressed under the control of the *pgro* promoter in the pFNLTP6*pgro* expression vector (Fig. 2A). The resulting plasmids were introduced in the *F. tularensis* LVS strain and expression of the tagged-proteins was verified by Western blot, using anti-tag antibody (15) on bacterial lysates. As shown in Fig. 2B, a band with the expected molecular weight (MW) was detected for the three recombinant proteins. An additional lower MW was also detected for MoxR-TAP, likely to correspond to a C-terminal proteolytic degradation product.

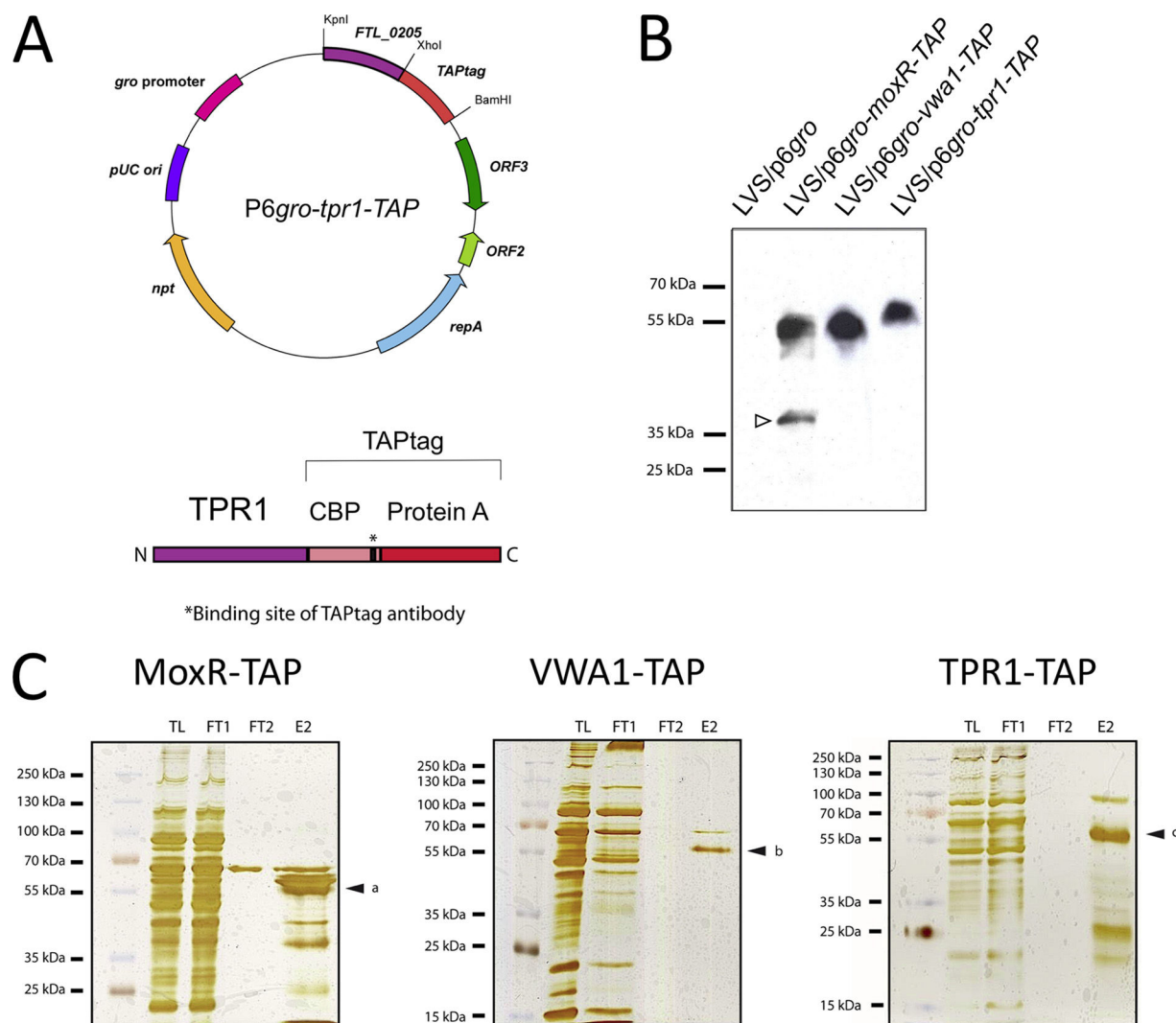
The three recombinant proteins were used individually as baits and their interacting LVS proteins were purified using a two-step elution procedure (15). In most cases, several bands were specifically eluted by this procedure (Fig. 2C). In each case, the MS-MS data obtained for each band were combined and analyzed to compact results in a single table for simplification.

Experiments were performed in biological replicates. One-dimensional SDS-PAGE protein profiles and MS-MS protein identifications obtained for each experiment were always compared with verify reproducibility. Results issued from triplicate experiments for MoxR-TAP and VWA1-TAP and duplicate experiments for TPR1-TAP are summarized in Tables IA–C. In each table, we chose as a threshold, the protein partners identified with at least two unique peptides and identified in at least two independent experiments.

Thirty-one different proteins interacting with MoxR-TAP were identified (Table IA), including MoxR-TAP itself. The most highly represented protein was FTL\_1714 (or GroEL). The other proteins identified encompassed various predicted biological activities (ranging from ribosomal proteins to hypothetical proteins). Eight proteins appeared to interact with VWA1-TAP, including VWA1-TAP itself (Table IB). The two most highly represented proteins (peptide number >10) were FTL\_1714 (GroEL) and FTL-1783 (or SucB), the E2 component of the 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) complex. Remarkably, TPR1 was also identified as a binding partner of VWA1-TAP. Finally, one hundred proteins interacting with TPR1-TAP were identified. These proteins belonged to various functional categories (Table 1C). TPR1-TAP itself was among the most highly represented proteins. The other highly represented proteins (18 proteins with >10 unique peptides) included notably the E1 components of OGDH and pyruvate dehydrogenase (PDH). The E2 components of the two complexes were also detected (FTL\_1783, OGDH E2; and FTL\_0310, PDH E2) as well as the E3 component common to both complexes (FTL\_0311, PDH/OGDH E3). Only one protein, FTL\_0207, encoded by the *moxR* locus was identified among the interactants of TPR1-TAP. In addition, the two subunits of the acetyl-CoA carboxyl transferase (ACC- $\alpha$  and ACC- $\beta$ ) were identified (12 peptides each).

**BACTH Analyses**—The bacterial two-hybrids (BACTH) system was used to confirm several of the interacting partners





**FIG. 2. Construction of MoxR, VWA1 and TPR1 tagged proteins.** *A*, Constructions. *Left* panel, the 5.1 kb *p6gro*-derived recombinant plasmid carrying the fusion gene *tp1-Tap* under the control of the *pgro* promoter. *Right* panel, schematic representation of the different parts of the TPR1-TAP protein. The protein A and calmodulin binding (CBP) domains of the TAP sequence have been fused immediately downstream of the last residue of TPR1. *B*, Western-blot analyses. The recombinant proteins were expressed from *p6gro*-derived plasmids in LVS. The three proteins carry the TAPtag sequence at their C-terminal end. Western blot analysis was performed on whole cell extracts to verify production and stability of TAP-tagged proteins, using a polyclonal anti-TAPtag antibody. The three recombinant proteins were detected at the expected molecular weight (a, MoxR-TAP; b, VWA1-TAP; c, TPR1-TAP). The open arrow indicates the position of a probable degradation product of MoxR-TAP. Wild-type LVS strain was used as a negative control. *C*, TAP tag purification. TL, whole cell lysate; FT1, flow-through of the first purification column; FT2, flow-through of the second purification column; E2, final elution sample from the second column. The arrows indicate the protein band in which peptides corresponding to the bait were the most abundant. Molecular weight markers are indicated to the left of the figure (in kDa).

identified in the TAPtag approach. We focused in particular on the interactions of MoxR and TPR1 with the OGDH E2 subunit (FTL-1783 or SucB), as well as on the interactions of TPR1 with the three subunits of PDH (FTL\_0309, FTL\_0310, FTL\_0311) and with the acetyl CoA carboxylase- $\alpha$  subunit (FTL\_0295).

The FTL proteins moieties were fused to the proximal portion (designated CyaA-T25, vectors pKT25 and pKNT25) or to the distal portion (designated CyaA-T18, vector pUT18C) of the catalytic domain of adenylate cyclase (Table II). Briefly,

genes *moxR* and *tp1* were cloned into plasmid pKT25 (C-terminal fusions to CyaA-T25). The gene *tp1* was also cloned into plasmid pKNT25 (N-terminal fusion to CyaA-T25). The genes *FTL-1783*, *FTL-0309*, *FTL-0310*, *FTL-0311*, *FTL-0295*, were cloned into plasmid pUT18C encoding the distal domain of CyaA (C-terminal fusions to CyaA-T18). Each pair of recombinant bait (CyaA-T25, pKT derivatives)/prey (CyaA-T18, pUT derivatives) plasmids was introduced into the *E. coli* cya-strain BTH101. The interaction CyaA-T25 + CyaA-T18, reconstituting catalytic CyaA activity and leading to the production

TABLE I

Accession UniProtKB	Gene name	FTL number	Protein description	Unique peptides
A. MoxR-TAP. Dieppedale <i>et al.</i>				
P94798	<i>groEL</i>	FTL_1714	60 kDa chaperonin**	36
Q2A5K6	<i>moxR</i>	FTL_0200	MoxR family ATPase**	23
Q9ZAW3	<i>ftsZ</i>	FTL_1907	Cell division protein FtsZ**	12
Q2A5L9	<i>pheC</i>	FTL_0187	Cyclohexadienyl dehydratase*	8
Q2A328	<i>dnaK</i>	FTL_1191	Chaperone protein DnaK*	8
Q2A1M4	<i>rplA</i>	FTL_1747	50S ribosomal protein L1*	7
Q2A1Z7	<i>pckA</i>	FTL_1616	Phosphoenolpyruvate carboxykinase*	7
Q2A358	<i>iglD</i>	FTL_0114/FTL_1160	Intracellular growth locus protein D*	7
Q2A3U7	<i>phoH</i>	FTL_0885	PhoH-like protein**	6
Q2A639	<i>dnaN</i>	FTL_0002	DNA polymerase III $\beta$ subunit**	5
Q2A499		FTL_0702	Hypothetical protein*	5
Q2A5I2	<i>rpsB</i>	FTL_0224	30S ribosomal protein S2*	4
Q2A5G4	<i>rpsC</i>	FTL_0242	30S ribosomal protein S3*	4
Q2A360	<i>iglB</i>	FTL_0112/FTL_1158	Intracellular growth locus protein B*	4
Q2A5E6	<i>rpsD</i>	FTL_0260	30S ribosomal protein S4*	3
Q2A5H0	<i>rplC</i>	FTL_0236	50S ribosomal protein L3*	3
Q2A2S5		FTL_1306	Putative uncharacterized protein*	3
Q2A5E5	<i>rpoA1</i>	FTL_0261	DNA-directed RNA polymerase $\alpha_1$ subunit*	3
Q2A198		FTL_0265	Glycosyltransferase containing DXD motif*	3
Q2A4H7	<i>rpoA2</i>	FTL_0616	DNA-directed RNA polymerase $\alpha_2$ subunit*	3
Q2A1I0	<i>atpA</i>	FTL_1797	ATP synthase $\alpha$ subunit*	3
Q2A4R4	<i>minD</i>	FTL_0519	Septum site-determining protein MinD*	2
Q2A370		FTL_1146	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*	2
Q2A3K7	<i>mdh</i>	FTL_0987	Malate dehydrogenase*	2
Q2A253	<i>sucC</i>	FTL_1553	Succinyl-CoA ligase $\beta$ subunit*	2
Q2A5I1	<i>tsf</i>	FTL_0225	Elongation factor Ts*	2
Q2A3U2	<i>tig</i>	FTL_0891	Trigger factor*	2
Q2A1J4	<i>sucB</i>	FTL_1783	Oxoglutarate dehydrogenase E2 component*	2
Q0BNJ4	<i>tolB</i>	FTL_0334	Protein TolB*	2
Q2A368	<i>pyk</i>	FTL_1148	Pyruvate kinase*	2
1B. VWA1-TAP. Dieppedale <i>et al.</i>				
P94798	<i>groEL</i>	FTL_1714	60 kDa chaperonin**	43
Q2A1J4	<i>sucB</i>	FTL_1783	Oxoglutarate dehydrogenase E2 component*	14
Q2A328	<i>dnaK</i>	FTL_1191	Chaperone protein DnaK**	8
Q2A5E0	<i>htpG</i>	FTL_0267	Chaperone protein HtpG*	4
Q2A5K5	<i>vwa1</i>	FTL_0201	Hypothetical protein	3
Q2A1M0	<i>tuf</i>	FTL_1751	Elongation factor Tu*	3
Q2A5K1	<i>tpr1</i>	FTL_0205	Tetratrico peptide repeat*	2
Q2A368	<i>pyk</i>	FTL_1148	Pyruvate kinase	2
1C. TPR1-TAP. Dieppedale <i>et al.</i>				
Q2A328	<i>dnaK</i>	FTL_1191	Chaperone protein DnaK*	55
Q2A5E0	<i>htpG</i>	FTL_0267	Chaperone protein HtpG*	34
P94798	<i>groEL</i>	FTL_1714	60 kDa chaperonin*	21
<b>Q2A5A0</b>	<b><i>aceE</i></b>	<b>FTL_0309</b>	<b>Pyruvate dehydrogenase E1 component</b>	<b>21</b>
Q2A5K1	<i>tpr1</i>	FTL_0205	Tetratrico peptide repeat*	19
Q2A4Q0	<i>gyrA</i>	FTL_0533	DNA gyrase, subunit A	17
Q2A5V6	<i>clpB</i>	FTL_0094	AAA superfamily ATPase ClpB	15
Q2A1M4	<i>rplA</i>	FTL_1747	50S ribosomal protein L1*	15
Q2A5I2	<i>rpsB</i>	FTL_0224	30S ribosomal protein S2*	15
Q2A1G8	<i>infB</i>	FTL_1809	Translation initiation factor IF-2*	14
<b>Q2A1J3</b>	<b><i>sucA</i></b>	<b>FTL_1784</b>	<b>Oxoglutarate dehydrogenase E1 component</b>	<b>14</b>
Q2A432		FTL_0785	GTP-binding protein	13
Q2A2S2	<i>accD</i>	FTL_1309	Acetyl-CoA carboxylase $\beta$ subunit*	12
Q2A5B4	<i>accA</i>	FTL_0295	Acetyl-coA carboxylase $\alpha$ subunit	12
Q2A3T9	<i>lon</i>	FTL_0894	ATP-dependent protease La	12
Q2A1M8	<i>rpoC</i>	FTL_1743	DNA-directed RNA polymerase $\beta$ subunit*	12
Q2A1K3	<i>acnA</i>	FTL_1772	Aconitate hydratase	11

TABLE I—continued

Accession UniProtKB	Gene name	FTL number	Protein description	Unique peptides
Q2A5G4	<i>rpsC</i>	<i>FTL_0242</i>	30S ribosomal protein S3*	11
Q2A360	<i>iglB</i>	<i>FTL_0112/FTL1158</i>	Intracellular growth locus protein B*	10
Q2A180	<i>rpsA</i>	<i>FTL_1912</i>	30S ribosomal protein S1*	9
Q2A298	<i>katG</i>	<i>FTL_1504</i>	Catalase-peroxidase*	9
Q2A2S5		<i>FTL_1306</i>	Hypothetical protein	9
Q2A5C7	<i>dnaJ</i>	<i>FTL_0281</i>	Chaperone DnaJ*	9
<b>Q2A1J4</b>	<b><i>sucB</i></b>	<b><i>FTL_1783</i></b>	<b>Oxoglutarate dehydrogenase E2 component*</b>	<b>9</b>
Q2A632	<i>ompH</i>	<i>FTL_0009</i>	Outer membrane protein*	9
Q2A5E6	<i>rpsD</i>	<i>FTL_0260</i>	30S ribosomal protein S4*	9
Q2A3U2	<i>tig</i>	<i>FTL_0891</i>	Trigger factor*	9
Q2A2Z4		<i>FTL_1225</i>	Lipoprotein, putative*	8
<b>Q2A598</b>	<b><i>lpd</i></b>	<b><i>FTL_0311</i></b>	<b>Dihydrolipoyl dehydrogenase*</b>	<b>8</b>
Q2A5J9	<i>pcp</i>	<i>FTL_0207</i>	Pyrrolidone-carboxylate peptidase*	8
Q2A5L9	<i>pheC</i>	<i>FTL_0187</i>	Cyclohexadienyl dehydratase*	8
Q2A3H1	<i>rluB</i>	<i>FTL_1030</i>	Pseudouridine synthase	7
Q2A427	<i>era</i>	<i>FTL_0790</i>	GTP-binding protein Era	6
Q2A4W8	<i>parC</i>	<i>FTL_0462</i>	DNA topoisomerase IV, $\alpha$ subunit	6
Q2A1U2		<i>FTL_1678</i>	Hypothetical protein	6
Q2A1M0	<i>tuf</i>	<i>FTL_1751</i>	Elongation factor Tu*	6
Q2A383	<i>suhB</i>	<i>FTL_1132</i>	Inositol-1-monophosphatase*	5
Q2A2M7	<i>iclR</i>	<i>FTL_1364</i>	Transcriptional regulator, IclR family*	5
Q9ZAW3	<i>ftsZ</i>	<i>FTL_1907</i>	Cell division protein FtsZ*	5
<b>Q2A599</b>	<b><i>aceF</i></b>	<b><i>FTL_0310</i></b>	<b>Pyruvate dehydrogenase E2 component*</b>	<b>5</b>
Q2A1I0	<i>atpA</i>	<i>FTL_1797</i>	F0F1 ATP synthase $\alpha$ subunit*	5
Q2A2J1	<i>infC</i>	<i>FTL_1406</i>	Translation initiation factor IF-3	5
Q2A2H7		<i>FTL_1420</i>	Carbohydrate/purine kinase PkfB family	5
Q2A5F5	<i>rplF</i>	<i>FTL_0251</i>	50S ribosomal protein L6	5
Q2A193	<i>glnA</i>	<i>FTL_1899</i>	Glutamine synthetase*	4
Q2A4K8	<i>fadB/acbP</i>	<i>FTL_0584</i>	Hydroxacyl-CoA dehydrogenase/acyl-CoA-binding protein	4
Q2A377	<i>fabG</i>	<i>FTL_1139</i>	3-oxoacyl-(Acyl-carrier) reductase*	4
Q2A2C4		<i>FTL_1477</i>	Thiamine pyrophosphokinase	4
Q2A263	<i>mutM</i>	<i>FTL_1543</i>	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	4
Q2A2T8		<i>FTL_1293</i>	Hypothetical protein	4
Q2A502	<i>parB</i>	<i>FTL_0428</i>	Chromosome partition protein B	4
Q2A5X6	<i>lepA</i>	<i>FTL_0071</i>	GTP-binding protein LepA	4
Q2A269	<i>pnp</i>	<i>FTL_1537</i>	Polynucleotide phosphorylase/polyadenylase*	4
Q2A3I6		<i>FTL_1015</i>	AhpC/TSA family protein- Peroxiredoxin*	4
Q2A4M0		<i>FTL_0572</i>	Hypothetical protein*	4
Q2A1M7	<i>rpoB</i>	<i>FTL_1744</i>	DNA-directed RNA polymerase $\beta$ subunit	4
Q2A2E3	<i>secA</i>	<i>FTL_1458</i>	Protein translocase subunit SecA	4
Q2A303		<i>FTL_1216</i>	Hypothetical protein	4
Q2A5S1	<i>ppdK</i>	<i>FTL_0132</i>	Pyruvate phosphate dikinase	3
Q2A259	<i>gyrB</i>	<i>FTL_1547</i>	DNA gyrase $\beta$ subunit	3
Q2A2K5	<i>deaD</i>	<i>FTL_1392</i>	cold-shock DEAD-box protein A	3
Q2A3E5	<i>dacD</i>	<i>FTL_1060</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase*	3
Q2A358	<i>iglD</i>	<i>FTL_0114/FTL_1160</i>	Intracellular growth locus protein D	3
Q2A346	<i>pdpA</i>	<i>FTL_0162/FTL_1172</i>	Pathogenicity determinant protein PdpA	3
Q2A1F6	<i>nuoG</i>	<i>FTL_1824</i>	NADH dehydrogenase subunit G	3
Q2A4R4	<i>minD</i>	<i>FTL_0519</i>	Septum site-determining protein MinD	3
Q2A3U7	<i>phoH</i>	<i>FTL_0885</i>	PhoH-like protein	3
Q2A356	<i>pdpC</i>	<i>FTL_0116/FTL_1162</i>	Pathogenicity determinant protein PdpC	3
Q2A4B2	<i>araC</i>	<i>FTL_0689</i>	Transcriptional regulator AraC family	3
Q2A5H2	<i>fusA</i>	<i>FTL_0234</i>	Elongation factor G	3
Q2A329	<i>grpE</i>	<i>FTL_1190</i>	Heat shock protein GrpE*	3
Q2A374	<i>plsX</i>	<i>FTL_1142</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX*	3
Q2A5P0	<i>usp</i>	<i>FTL_0166</i>	Universal stress protein*	3
Q2A415	<i>putA</i>	<i>FTL_0805</i>	Bifunctional proline dehydrogenase	3
Q2A580	<i>tolB</i>	<i>FTL_0334</i>	Protein TolB	3
Q2A639	<i>dnaN</i>	<i>FTL_0002</i>	DNA polymerase III $\beta$ subunit	2
Q2A211	<i>hemB</i>	<i>FTL_1602</i>	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	2

TABLE I—continued

Accession UniProtKB	Gene name	FTL number	Protein description	Unique peptides
Q2A264		FTL_1542	AMP-binding protein	2
Q2A2Q8	<i>fopA</i>	FTL_1328	OmpA family protein*	2
Q2A2U7	<i>gshB</i>	FTL_1284	Glutathione synthetase	2
Q2A3R1	<i>elbB</i>	FTL_0928	Isoprenoid biosynthesis protein	2
Q2A3Z9	<i>cphA</i>	FTL_0831	Cyanophycin synthetase	2
Q2A2F5	<i>fabL</i>	FTL_1442	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	2
Q2A368	<i>pyk</i>	FTL_1148	Pyruvate kinase*	2
-		FTL_0629	Pseudogene	2
Q2A4K6	<i>fadD</i>	FTL_0586	Long chain fatty acid CoA ligase	2
Q2A1B9	<i>pcm</i>	FTL_1866	L-isoaspartate O-methyltransferase*	2
Q2A4N4		FTL_0552	Two-component response regulator	2
Q2A378	<i>acpP</i>	FTL_1138	Acyl carrier protein	2
Q2A2H1		FTL_1426	Hypothetical protein	2
Q2A5X9	<i>gmhA</i>	FTL_0068	Phosphoheptose isomerase	2
Q2A484	<i>rne</i>	FTL_0717	Ribonuclease E	2
Q2A4B1	<i>fadD1</i>	FTL_0690	Long chain fatty acid CoA ligase	2
Q2A359	<i>iglC</i>	FTL_0113/FTL_1159	Intracellular growth locus protein C	2
Q2A3S7	<i>ysxC</i>	FTL_0906	Ribosome biogenesis protein YsxC	2
Q2A4C7	<i>panC</i>	FTL_0673	Pantoate-b-alanine ligase	2
Q2A4P4	<i>lpxA</i>	FTL_0539	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	2
Q2A503	<i>parA</i>	FTL_0427	Chromosome partition protein A	2
P18149	<i>lpnA</i>	FTL_0421	Lipoprotein*	2
Q2A265	<i>mraW</i>	FTL_1541	S-adenosyl-methyltransferase MraW	2

TABLE II  
BACTH. Dieppedale et al.

pKT25	MoxR (C-ter)	TPR1 (C-ter)	TPR1 (N-ter)
pUT18			
-	-	-	-
FTL_1783 (C-ter)	++	+	+
FTL_0309 (C-ter)	nt	-	+
FTL_0310 (C-ter)	nt	-	+
FTL_0311 (C-ter)	nt	±	±
FTL_0295 (C-ter)	nt	+	++

of cAMP, was monitored by the hydrolysis of the lactose analog X-Gal on LB- X-Gal plates. As summarized in Table II, MoxR-CyaA-T25 and FTL\_1783-CyaA-T18 recombinant proteins interacted together to produce cAMP. The TPR1-CyaA-T25 N-terminal fusion interacted with all the protein partners tested whereas the CyaA-T25-TPR1 C-terminal fusion interacted only with 3/5 of them. Altogether, this assay confirmed the interactions of MoxR with the E2 subunit of the OGDH complex; and of TPR1 with the OGDH E2 subunit, the PDH complex as well as with the ACC  $\alpha$  subunit.

**Construction and Characterization of a  $\Delta tpr1$  Chromosomal Deletion**—To further characterize the role of the protein TPR1 in *Francisella* pathogenesis, we constructed a clean chromosomal deletion of gene *tpr1* by allelic replacement, and a complemented strain by introducing a plasmid-born wild-type *tpr1* allele in LVS $\Delta tpr1$ . Expression of gene *tpr1* was monitored by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) in these strains. As expected, expression of *tpr1* was abolished in the deletion strain and introduction of a plasmid-born wild-

type *tpr1* allele led to high level expression of the *tpr1* gene (supplemental Fig. S2). We also monitored expression of the gene *FTL\_0206* lying immediately downstream of *tpr1* (Fig. 1), in these strains. An ~2-fold reduction in *FTL\_0206* gene expression was recorded in the  $\Delta tpr1$  mutant background (supplemental Fig. S2), reflecting a polar effect of the clean deletion. Reduced expression of *FTL\_0206* was still observed in the *tpr1*-complemented strain. We therefore constructed a new complemented strain by introducing in the  $\Delta tpr1$  mutant a plasmid expressing both *tpr1* and *FTL\_0206* genes. In this new complemented strain, expression of both genes *tpr1* and *FTL\_0206* was fully restored (supplemental Fig. S2). The characteristics of the wild-type,  $\Delta tpr1$  mutant and complemented strains were followed in different stress conditions as well as in human macrophages and *in vivo*.

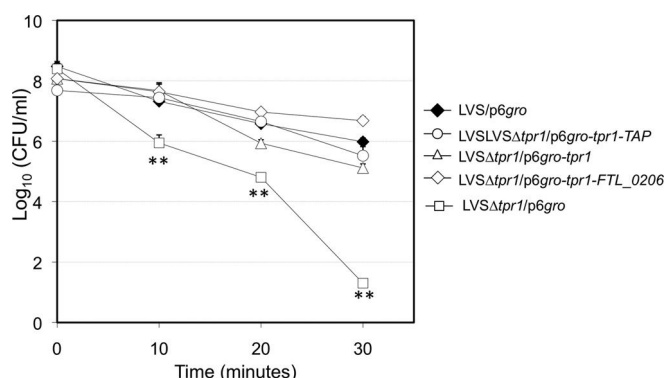
**Sensitivity to Oxidative, pH and Other Stresses**—Upon *Francisella* entry into cells, the phagosomal compartment transiently acidifies and the activation of NADPH oxidase leads to the production of noxious oxygen reactive species (23, 24). Thus, we first tested the survival of parental LVS, LVS $\Delta tpr1$  mutant and complemented strains, under oxidative stress conditions.

For this, bacteria were exposed to 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (~10 mM) (Fig. 3). The  $\Delta tpr1$  deletion mutant strain (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro) appeared to be extremely sensitive to oxidative stress as compared with the wild-type strain (LVS/p6gro). Indeed, it showed a 25-fold decrease in the number of viable bacteria already after 10 min, and an ~50,000-fold decrease after 30 min of exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Remarkably, the two complemented



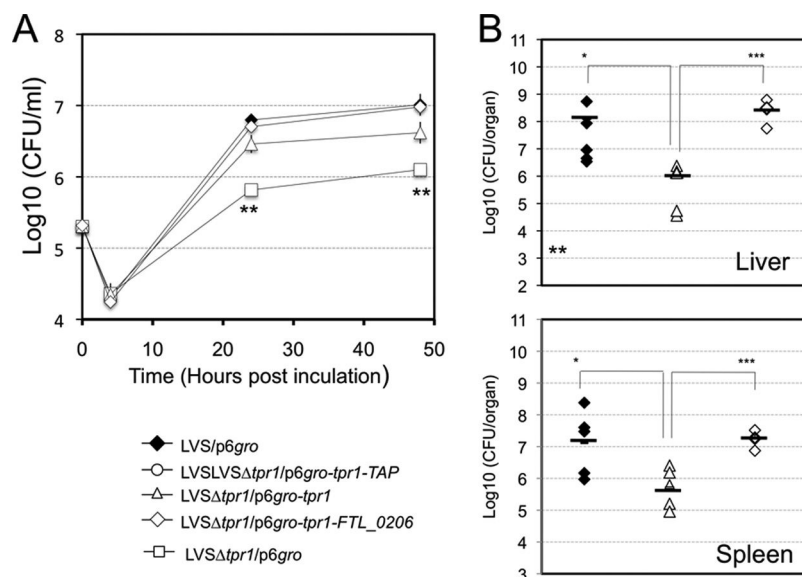
strains, harboring either a plasmid-born copy of gene *tpr1* alone (plasmid p6gro-*tpr1*) or of genes *tpr1* and *FTL\_0206* (p6gro-*tpr1* or p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*) showed wild-type bacterial viability (Fig. 3). This assay confirmed that protein TPR1 specifically contributes to the adaptation of *F. tularensis* to oxidative stress. Notably, we also evaluated the capacity of the protein TPR1-TAP to complement the  $\Delta tpr1$  deletion mutant. This strain (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro-*tpr1*-TAP) showed resistance to oxidative stress similar to LVS and complemented strains, indicating a normal activity of the TPR1-TAP protein despite the presence of the C-terminal tag.

We next evaluated the ability of the LVS $\Delta tpr1$  mutant to endure acid stress, by incubating the LVS, LVS $\Delta tpr1$  and of the complemented strain (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*), in normal growth media adjusted to pH 4.0 (supplemental Fig.



**FIG. 3. Sensitivity to oxidative stress of LVS, LVS $\Delta tpr1$  and complemented strains.** Exponential-phase bacteria were diluted to a final concentration of  $10^8$  bacteria/ml in fresh Schaedler-K3 broth and subjected to oxidative stresses (10 mM  $H_2O_2$ ). The bacteria were plated on chocolate agar plates at different times, and viable bacteria were monitored 3 days after. Data are the average CFU/ml for three independent experiments for each condition. Results are shown as the averages of  $\log_{10}$  (CFU/ml)  $\pm$  standard deviations. \*\*  $p < 0.01$  (as determined by Student's *t* test).

**FIG. 4. In vitro and vivo properties of LVS $\Delta tpr1$ .** A, Intracellular replication of LVS, LVS $\Delta tpr1$  and the complemented strains was monitored over a 48 h period in THP-1 human macrophages. Results are shown as the averages of  $\log_{10}$  (CFU/ml)  $\pm$  standard deviations. \*\*  $p < 0.01$  (as determined by Student's *t* test). B, Bacterial burden in spleen and livers of mice infected with 250 CFU of wild-type LVS (LVS/p6gro, black diamonds),  $\Delta tpr1$  mutant (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro, open triangles) or complemented strain (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*, open diamonds). Results are shown as  $\log_{10}$  CFU per organ  $\pm$  standard deviations. Liver and spleen data at day 4, for LVS and LVS $\Delta tpr1$  infections, represent five mice. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (as determined by Student's *t* test).



S3A). Both LVS and LVS $\Delta tpr1$  were sensitive to low pH, but the LVS $\Delta tpr1$  mutant strain showed a 2,300-fold increase of mortality after 4 h. The complemented strain exhibited viability at the same level as the wild-type parent.

We also evaluated the impact of the  $\Delta tpr1$  deletion on bacteria subjected to heat, ethanol and SDS stresses. When subjected to high temperature (50 °C) (supplemental Fig. S3B), the number of viable bacteria of the LVS $\Delta tpr1$  mutant was 14-fold lower than that of the wild type strain after 1 h. In media containing 0.05% SDS (supplemental Fig. S3C), the number of mutant bacteria was 350-fold lower than of LVS bacteria after 4 h and the mutant resisted 15-fold less than LVS after 2 h and in media containing a high concentration of ethanol (10%) (supplemental Fig. S3D). In all four assays, the complemented strain (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*) exhibited viability at the same level as the wild-type parent.

Thus, the  $\Delta tpr1$  mutant appeared to be more sensitive than the wild-type strain to all the stresses tested, a characteristic resembling that previously observed with the  $\Delta moxR$  mutant (6). Remarkably, the  $\Delta moxR$  and  $\Delta tpr1$  mutants were both more sensitive to oxidative stress than to any other stress. Altogether, these data indicate that the proteins MoxR and TPR1 contribute to the adaptation of *F. tularensis* to a variety of stressful conditions and are particularly important for oxidative stress defense.

**Intracellular Survival and Multiplication**—We then examined the ability of the wild-type,  $\Delta tpr1$  mutant, and complemented strains, to multiply in human macrophages (THP-1 cell line) over a 48-h period. The  $\Delta tpr1$  mutant (LVS $\Delta tpr1$ /p6gro) showed an  $\sim 10$ -fold reduction of intracellular bacteria after 24 h and 48 h, as compared with the parental strain (LVS/p6gro) (Fig. 4A). Introduction of the complementing plasmid p6gro-*tpr1* restored partially bacterial multiplication in THP-1 cells. Indeed, after 24 h and 48 h of infection, multiplication of the complemented strain was improved as



compared with the deletion strain (~fivefold higher) but was still lower than that of the parental strain. The complemented strain expressing both *tpr1* and *FTL\_0206* genes (LVS $\Delta$ *tpr1*/p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*) showed wild-type intracellular survival and multiplication in macrophages (Fig. 4A), indicating that both *tpr1* and *FTL\_0206* genes contribute to LVS intracellular multiplication.

**In Vivo Properties**—We examined the virulence of wild-type LVS (LVS/p6gro),  $\Delta$ *tpr1* mutant (LVS $\Delta$ *tpr1*/p6gro) and complemented strain (LVS $\Delta$ *tpr1*/p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206*), in mice, by following the kinetics of bacterial multiplication in the target organs (spleen and liver) of infected animals (Fig. 4B). Groups of five BALB/c mice were infected with 250 bacteria by the intra-peritoneal route and mice were sacrificed at day 4 after the inoculation. At day 4, multiplication in the  $\Delta$ *tpr1* mutant strain significantly decreased as compared with the wild-type strain in both organs (25-fold and 63-fold, in the spleen and in the liver, respectively). Remarkably, complementation with plasmid p6gro-*tpr1*-*FTL\_0206* restored full virulence. Indeed, similar counts were recorded in the spleens of animals infected with the wild-type and complemented strains ( $\log_{10}$  6.2 versus  $\log_{10}$  6.38, respectively). The counts recorded in the livers were even 10-fold higher with the complemented strain than with the wild-type strain (Fig. 4B). These results thus confirm our earlier preliminary observations (6) on the participation of genes *tpr1* and *FTL\_0206* in *F. tularensis* virulence.

**MoxR and TPR1 Modulate OGDH and PDH Enzymatic Activities**—As mentioned above, all the subunits of the 2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) and pyruvate dehydrogenase (PDH) complexes interacted with TPR1-TAP. The TPR-bearing motif protein also interacted with the two subunits of Acetyl-CoA carboxylase (ACC). This observation led us to test the impact of *moxR* or *tpr1* inactivation on the activity of these three enzymatic complexes. The OGDH complex is a key enzyme in the TCA cycle which catalyzes the conversion of 2-oxoglutarate to succinyl-CoA, NADH and CO<sub>2</sub> (25). The PDH complex, an enzyme linking the glycolysis pathway and the TCA cycle, catalyzes the conversion of pyruvate in acetyl-CoA, NADH and CO<sub>2</sub> (25, 26). Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is a biotin-dependent multi-subunit enzyme (19) that catalyzes the irreversible carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA. This irreversible reaction is involved in fatty acid synthesis.

OGDH activity was assayed on bacterial lysates by measuring the reduction of NAD<sup>+</sup> at 340 nm in the presence of 16 mM oxoglutarate. PDH activity was assayed in the same conditions in the presence of 16 mM pyruvate. ACC activity was assayed on bacterial lysates by measuring the amount of coenzyme A formed at 412 nm, in the presence of malonyl-CoA (see Experimental procedures).

The protein TPR1 also interacted with the catalase KatG, responsible for the detoxification of bactericidal compounds such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fact that KatG has been shown previously to participate to *F. tularensis* oxidative stress response ((4)

and references therein), prompted us to monitor the catalase enzymatic activity in wild-type,  $\Delta$ *tpr1* and complemented strains. Catalase activity was assayed on bacterial lysates by measuring the conversion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>, using the Amplitude™ Fluorimetric Catalase Assay Kit (see Experimental procedures).

As shown in Fig. 5, PDH and OGDH activities dropped down to 30% of the wild-type activity in the lysate from the LVS $\Delta$ *moxR* mutant strain. Both enzymatic activities were also significantly reduced in the lysate from LVS $\Delta$ *tpr1* (18 and 29% reduction of activity for PDH and OGDH, respectively). We monitored expression of genes *FTL\_0309* and *FTL\_1784* (encoding PDH- and OGDH- E1 subunits, respectively) by qRT-PCR, in LVS and in the LVS $\Delta$ *tpr1*, strains (supplemental Fig. S4). Transcription of these two genes was unaffected in the  $\Delta$ *tpr1* mutant, strongly suggesting that the decrease in PDH and OGDH activities in this strain was not due to reduced protein expression.

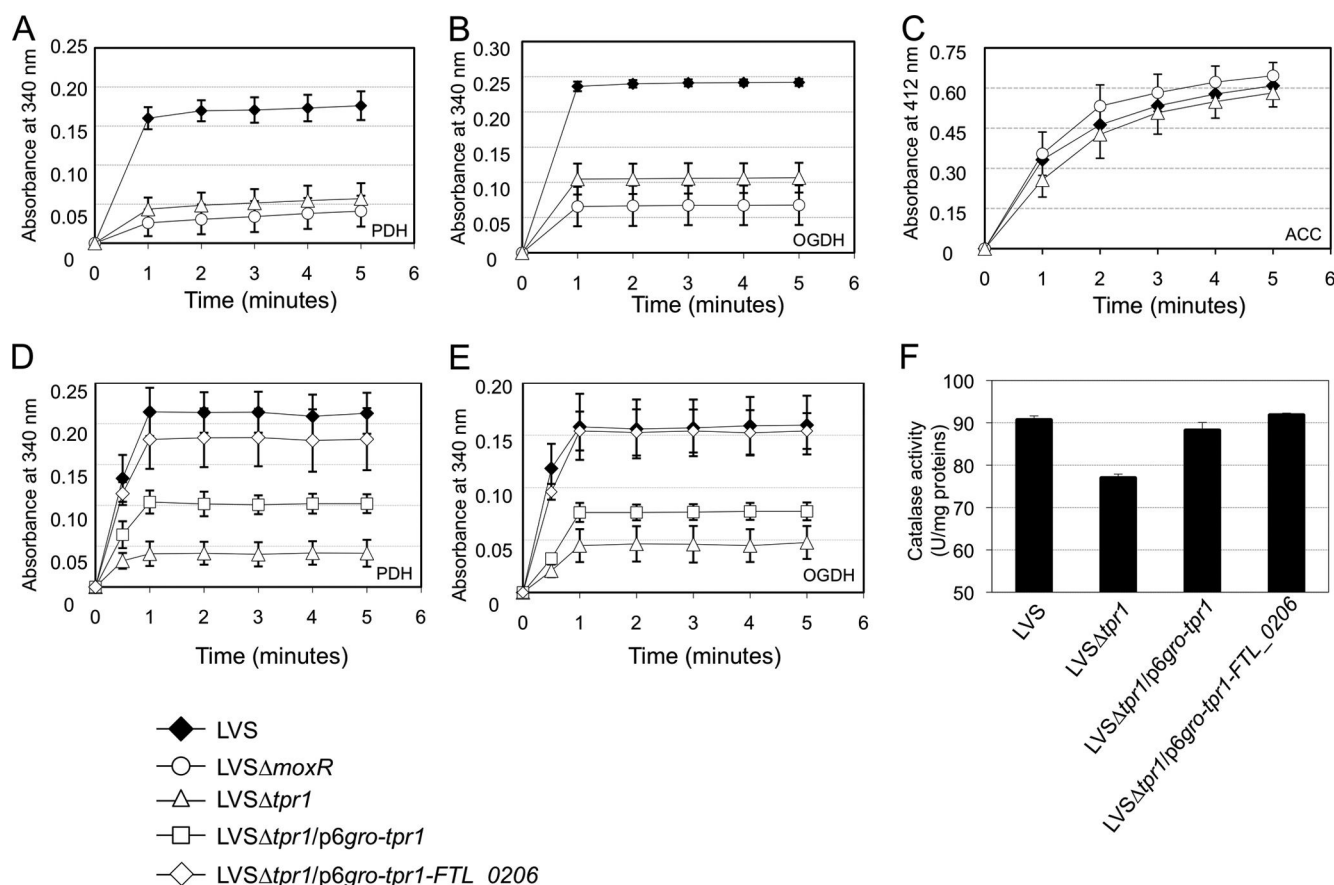
KatG activity was also moderately but significantly reduced in the  $\Delta$ *tpr1* mutant strain (17% reduction of activity) and wild-type activity was fully restored in the complemented strain (Fig. 5F). The background activity recorded in the  $\Delta$ *tpr1* strain is likely to be due to the remaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying activity of glutathione peroxidase and alkyl-hydroperoxide reductase. This assay confirmed, thus, the functional relevance of the interaction between the proteins TPR1 and KatG. Of note, inactivation of *katG*, in both *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain SCHU S4 or *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain LVS, resulted in enhanced susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. The oxidative stress defect of the LVS $\Delta$ *tpr1* mutant (see above) might thus be accounted by, at least in part, to an effect on this protein.

In contrast, ACC activity was not significantly affected in any of the two mutants as compared with LVS. Hence, the interaction of TPR1 with this enzyme is not critical for its activity, at least in the conditions tested.

## DISCUSSION

Using *in vivo* tandem affinity purification, combined with high-resolution mass spectrometry, we identified the interactomes of MoxR, VWA1 and TPR1, three proteins encoded by the *moxR* locus of *F. tularensis* LVS. The interacting proteins belonged to various functional categories, notably including key metabolic enzymes such as PDH and OGDH. We show here that inactivation of *tpr1* impairs bacterial virulence and affects bacterial stress defense. Remarkably, in both *moxR* and *tpr1* mutants, the activities of PDH and OGDH were altered, suggesting a possible link between stress defense and the tricarboxylic acid cycle in *F. tularensis* virulence.

**The Interactomes Show Partial Overlap**—We successfully identified some interactions between *moxR*-encoded proteins (VWA1 with TPR1, and TPR1 with *FTL\_0207*). However, we did not identify the reciprocal interactions (e.g. VWA1 was not identified in the TPR1-TAP interactome), possibly due to hin-



**FIG. 5. Enzymatic assays.** The assays were performed on total protein lysates. Panels A, B, C, compared the activities in wild-type LVS to those in  $\Delta\text{moxR}$  and  $\Delta\text{tpr1}$  mutant strains. Panels D, E, F, compared the activities in wild-type LVS to those in  $\Delta\text{tpr1}$  and complemented strains ( $\text{LVS}\Delta\text{tpr1/p6gro-tpr1}$  and  $\text{LVS}\Delta\text{tpr1/p6gro-tpr1-FTL}_{0206}$ ). (A, D) Pyruvate dehydrogenase assays were realized at 340 nm, over a reaction time of 10 min. (B, E) Oxoglutarate dehydrogenase assays were realized at 340 nm, over a reaction time of 5 min. (C) Acetyl-CoA carboxylase assay was realized at 412 nm over a reaction time of 5 min. Values were collected every minute. Each assay was performed on three independent protein lysates and each experiment was repeated twice. The average of absorbance  $\pm$  standard deviations, recorded for the wild-type LVS and mutant strains at the end of the reaction were significantly different (PDH,  $p < 0.05$ ; OGDH,  $p < 0.01$ , as determined by Student's  $t$  test). Ordinate, variation of absorbance. Abcissa, time (in min) of the reaction. F, Catalase activity assay was realized at 576 nm, using the Amplitude™ Fluorimetric Catalase Assay Kit. The assay was performed according to manufacturer's recommendation. Each assay was performed on three independent protein lysates and each experiment was repeated twice. The average of catalase activity (in unit/mg of total proteins)  $\pm$  standard deviations, recorded for the wild-type LVS and mutant strains at the end of the reaction were significantly different ( $p < 0.01$ , as determined by Student's  $t$  test). Ordinate, catalase activity.

drance caused by the presence of the C-terminal Tag. Further biochemical and structural studies will be required to characterize the nature of the oligomeric structures comprising these proteins.

In addition, to the *moxR*-encoded proteins, the three interactomes comprised a subset of common proteins. Remarkably, most of the proteins interacting with MoxR-TAP also interacted with either one or both of the two other TAP-tagged proteins. For example, two-third of the proteins interacting with MoxR-TAP (19/31) also interacted with TPR1-TAP. These included: 1) the general chaperones GroEL and DnaK; 2) trigger factor (Tig) and EF-Tu, involved in polypeptide chain elongation; 3) FtsZ and MinD, involved in cell division; 4) the pyruvate kinase (Pyk) and the OGDH E2 component, involved in metabolism; and v) the *Francisella* pathogenicity island

proteins IgIB and IgID. Similarly, all the proteins interacting with VWA1-TAP also interacted with proteins from the two other TAP-tagged interactomes. The proteins GroEL and DnaK constituted the most abundant peptides in most interactomes. It cannot be excluded that they correspond to non-specific protein-protein interactions because these two proteins are highly abundant in *F. tularensis* (27, 28).

The protein TPR1-TAP interacted with numerous proteins, including several enzymes or enzymatic complexes that were not detected in the other two interactomes.

In particular, if one considers as relevant interacting partners only the proteins identified with at least 10 peptides (Fig. 6), TPR1 appears to interact with: the PDH E1, and E2 subunits (AceE, AceF), the OGDH E1 and E2 subunits (SucA, SucB), their common E3 subunit (Lpd), the two subunits of

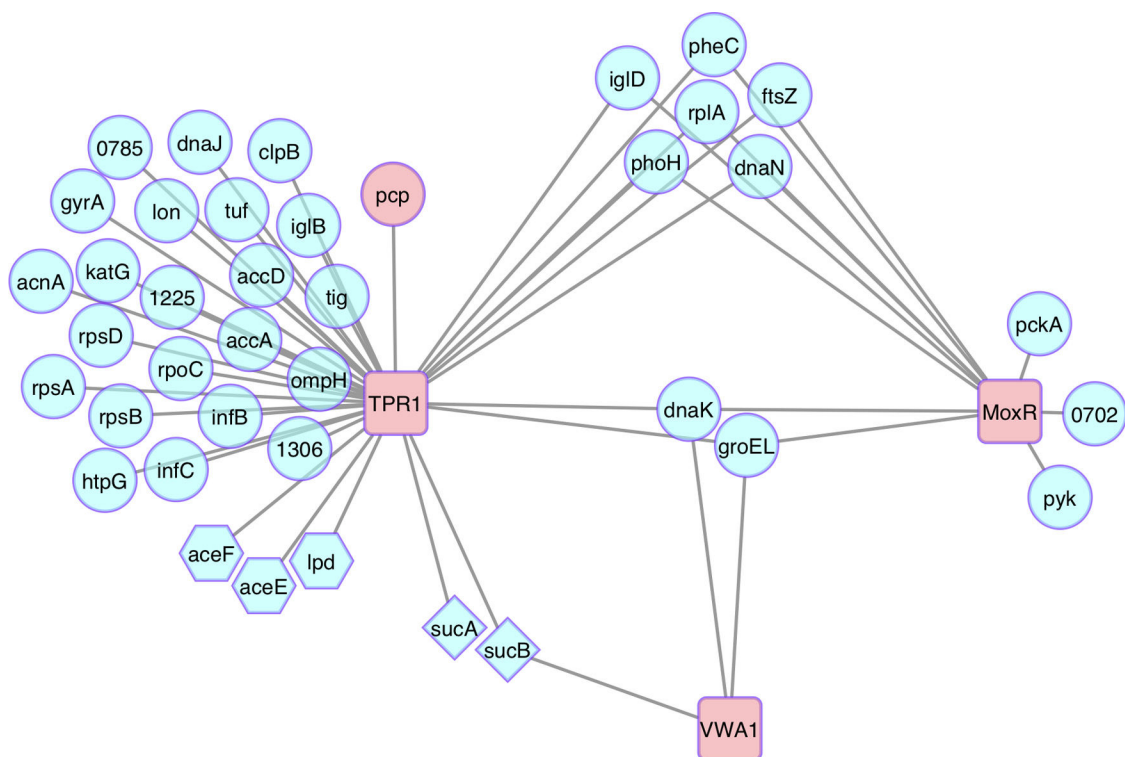


FIG. 6. **The MoxR-TAP, VWA1-TAP and TPR1-TAP interactomes.** MoxR-TAP, VWA1-TAP, and TPR1-TAP proteins were used as baits and are represented within red squares. In contrast, for the proteins identified with a unique bait, only the most abundant proteins are represented (identified with  $\geq 10$  total peptides). SucA and SucB (OGDH subunits) are in diamond shape. AceE, AceF and LpD (PHD subunits) are in hexagon shape. Pcp, encoded by the distal part of the *moxR* locus, is in red. This graphical representation was generated by using the Cytoscape software (freely available at <http://www.cytoscape.org>).

acetyl-CoA carboxylase (AccA, AccD), and KatG. Among these only the OGDH E2 subunit (SucB) belonged to another interactome (VWA1). This may reflect peculiar biochemical and/or structural properties of TPR1, favoring protein–protein interactions. The contribution of the other *moxR*-encoded proteins to these other enzymatic activities, if needed, might not require direct binding. Using the same threshold of 10 peptides, the TPR1 interactome shares eight proteins with the MoxR interactome and only three proteins with the VWA1 interactome (Fig. 6). The chaperones DnaK and GroEL are the only two proteins identified in the three interactomes.

**Stress Response, the TCA Cycle and Virulence**—Inactivation of either *moxR* or *tpr1* impaired bacterial stress defenses and also significantly altered PDH and OGDH activities. OGDH is an enzymatic complex composed of multiple copies of three different subunits: the 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1, FTL\_1784), the dihydrolipoamide succinyltransferase (E2, FTL\_1783), and the lipoamide dehydrogenase (lpd or E3, FTL\_0311) that is shared with pyruvate dehydrogenase (supplemental Fig. S4). The OGDH complex, which constitutes the primary site of control of the metabolic flux through the TCA cycle, has been also shown to be involved in the protection of the bacterium against reactive nitrogen intermediates and oxidative stress generated by the host immune system (see for a review (29)). The PDH enzymatic complex is composed

of three components: the pyruvate dehydrogenase (E1 component, FTL\_0309), the dihydrolipoamide transacetylase (E2 component, FTL\_0310) and the dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component, FTL\_0311). In both complexes the E2 component forms a multimeric core, which binds the peripheral E1 and E3 subunits. The substrate is decarboxylated by the E1 component dependant of thiamine pyrophosphate. Then, it is oxidized and transiently acetylated by E2 component.

In *F. tularensis*, the genes encoding the E1 and E2 subunits of OGDH complex are predicted to be essential genes (30) which probably accounts for the fact that they have not been identified in earlier *in vitro* and *in vivo* genetic screens as potential virulence factors. In contrast, the genes encoding the E1 and E2 subunits of PDH, as well as that encoding the shared E3 subunit are not essential. Indeed, the gene *aceE*, encoding PDH E1 subunit in *F. novicida* (FTN\_1494), was identified in a recent screen as important for intracellular survival (31). Inactivation of the *lpd* gene (encoding the E3 subunit) was also found to affect the virulence of *F. tularensis* LVS (32). Interestingly, in *Mycobacterium tuberculosis*, the Lpd protein is part of an antioxidant defense system in addition to its role in intermediary metabolism (33). Hence, it is also possible that Lpd participates in defense against oxidative stress in *F. tularensis*. Of note, in *S. typhimurium*, a



$\Delta$ *sucAB* mutant (lacking OGDH E1 and E2, and thus unable to make succinyl-CoA) was shown to be avirulent in the mouse model (34). Interestingly, Richardson *et al.* recently showed that *S. typhimurium* became auxotroph for methionine and lysine under nitrosative stress, because of reduced succinyl-CoA availability (35).

Our work suggested possible connections between stress response and metabolism in pathogenic *F. tularensis*. The proteins MoxR, VWA1, TPR1, and possibly other *moxR*-encoded proteins, might assist multiple enzymatic activities, including the tricarboxylic acid cycle-related PDH and OGDH. Further work will be required to make precise the molecular mechanisms involved in these interactions and their importance for intracellular survival and multiplication of the bacterium. More generally, the fact that similar *moxR*-like loci exists in several other intracellular bacteria, such as for example *Legionella* species, suggest functions carried by *moxR*-encoded proteins might be shared by other pathogenic organisms.

**Acknowledgments**—We thank Monique Barel for careful reading of the manuscript. We thank all the personnel of the 3P5 Proteomics facility, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité.

\* This study was supported by INSERM, CNRS, and Université Paris Descartes Paris V. Jennifer Dieppedale and Gael Gesbert were funded by a fellowship from the Délégation Générale à l'Armement (DGA) and Elodie Ramond by a fellowship from the "Région Ile de France."

 This article contains supplemental material.

\*\* The authors contributed equally to this work.

|| To whom correspondence should be addressed: Bâtiment Le-riche, 96 rue Didot 75993 Paris Cedex 14 France. Tel.: 0033-1-72606511; E-mail: alain.charbit@inserm.fr.

#### REFERENCES

- Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., Van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., Maidhof, H., and Gouvras, G. (2004) Bichat guidelines for the clinical management of tularaemia and bioterrorism-related tularaemia. *Euro. Surveill.* **9**, E9–E10
- McLendon, M. K., Apicella, M. A., and Allen, L. A. (2006) *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 167–185
- Keim, P., Johansson, A., and Wagner, D. M. (2007) Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1105**, 30–66
- Sjostedt, A., (Ed.) (2011) *Francisella tularensis* and tularaemia. *Frontiers Media SA*
- Oyston, P. C. (2008) *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J. Med. Microbiol.* **57**, 921–930
- Dieppedale, J., Sobral, D., Dupuis, M., Dubail, I., Klimentova, J., Stulik, J., Postic, G., Frapy, E., Meibom, K. L., Barel, M., and Charbit, A. (2011) Identification of a putative chaperone involved in stress resistance and virulence in *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **79**, 1428–1439
- Wong, K. S., and Houry, W. A. (2012) Novel structural and functional insights into the MoxR family of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* **179**, 211–221
- Li, Y. (2011) The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1487–1499
- Whittaker, C. A., and Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3369–3387
- Main, E. R., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L., and Regan, L. (2003) Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure* **11**, 497–508
- Cerveny, L., Straskova, A., Dankova, V., Hartlova, A., Ceckova, M., Staud, F., and Stulik, J. (2013) Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. *Infect. Immun.* **81**, 629–635
- Golovliov, I., Sjostedt, A., Mokrievich, A., and Pavlov, V. (2003) A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**, 273–280
- Maier, T. M., Pechous, R., Casey, M., Zahrt, T. C., and Frank, D. W. (2006) In vivo Himar1-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1878–1885
- Gully, D., and Bouveret, E. (2006) A protein network for phospholipid synthesis uncovered by a variant of the tandem affinity purification method in *Escherichia coli*. *Proteomics* **6**, 282–293
- Stingl, K., Schauer, K., Ecobichon, C., Labigne, A., Lenormand, P., Rouselle, J. C., Namane, A., and de Reuse, H. (2008) In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2429–2441
- Ladant, D., and Karimova, G. (2000) Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria. *Res. Microbiol.* **151**, 711–720
- Humphries, K. M., and Szveda, L. I. (1998) Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**, 15835–15841
- Hoffman, P. S., Sisson, G., Croxen, M. A., Welch, K., Harman, W. D., Cremades, N., and Morash, M. G. (2007) Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 868–876
- Santoro, N., Brtva, T., Roest, S. V., Siegel, K., and Waldrop, G. L. (2006) A high-throughput screening assay for the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Anal. Biochem.* **354**, 70–77
- Sasse, J., and Gallagher, S. R. (2008) Detection of proteins on blot transfer membranes. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 8: Unit 8 10B
- Johansson, A., Goransson, I., Larsson, P., and Sjostedt, A. (2001) Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3140–3146
- Wehrly, T. D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Child, R., Edwards, J. A., Brouwer, D., Nair, V., Fischer, E. R., Wicke, L., Curda, A. J., Kupko, J. J. 3<sup>rd</sup>, Martens, C., Crane, D. D., Bosio, C. M., Porcella, S. F., and Celli, J. (2009) Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiol.* **11**, 1128–1150
- Elkins, K. L., Cowley, S. C., and Bosio, C. M. (2007) Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1105**, 284–324
- McCaffrey, R. L., Schwartz, J. T., Lindemann, S. R., Moreland, J. G., Buchan, B. W., Jones, B. D., and Allen, L. A. (2010) Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 791–805
- Stobbe, M. D., Houten, S. M., van Kampen, A. H., Wanders, R. J., and Moerland, P. D. (2012) Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J.* **26**, 3625–3633
- Song, J., and Jordan, F. (2012) Interchain acetyl transfer in the E2 component of bacterial pyruvate dehydrogenase suggests a model with different roles for each chain in a trimer of the homooligomeric component. *Biochemistry* **51**, 2795–2803
- Ericsson, M., Tarnvik, A., Kuoppa, K., Sandstrom, G., and Sjostedt, A. (1994) Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* **62**, 178–183
- Hubalek, M., Hernychova, L., Havlasova, J., Kasalova, I., Neubauerova, V., Stulik, J., Macela, A., Lundqvist, M., and Larsson, P. (2003) Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J. Chromatogr.* **787**, 149–177
- Spalding, M. D., and Prigge, S. T. (2010) Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 200–228
- Gallagher, L. A., Ramage, E., Jacobs, M. A., Kaul, R., Brittnacher, M., and Manoil, C. (2007) A comprehensive transposon mutant library of *Francisella novicida*, a bioweapon surrogate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1009–1014
- Asare, R., and Kwai, Y. A. (2010) Molecular complexity orchestrates modulation of phagosome biogenesis and escape to the cytosol of macrophages by *Francisella tularensis*. *Environ. Microbiol.* **12**, 2559–2586

32. Meibom, K. L., Dubail, I., Dupuis, M., Barel, M., Lenco, J., Stulik, J., Golovliov, I., Sjöstedt, A., and Charbit, A. (2008) The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Mol. Microbiol.* **67**, 1384–1401
33. Venugopal, A., Bryk, R., Shi, S., Rhee, K., Rath, P., Schnappinger, D., Ehrt, S., and Nathan, C. (2011) Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* depends on lipoamide dehydrogenase, a member of three multienzyme complexes. *Cell Host Microbe.* **9**, 21–31
34. Mercado-Lubo, R., Leatham, M. P., Conway, T., and Cohen, P. S. (2009) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **77**, 1397–1405
35. Richardson, A. R., Payne, E. C., Younger, N., Karlinsey, J. E., Thomas, V. C., Becker, L. A., Navarre, W. W., Castor, M. E., Libby, S. J., and Fang, F. C. (2011) Multiple targets of nitric oxide in the tricarboxylic acid cycle of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe.* **10**, 33–43

## Références Bibliographiques

- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Alkhuder, K., Meibom, K.L., Dubail, I., Dupuis, M., and Charbit, A. (2009). Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 5, e1000284.
- Alkhuder, K., Meibom, K.L., Dubail, I., Dupuis, M., and Charbit, A. (2010). Identification of trkH, Encoding a Potassium Uptake Protein Required for *Francisella tularensis* Systemic Dissemination in Mice. *PLoS One* 5, e8966.
- Almagro-Moreno, S., and Boyd, E.F. (2009a). Sialic Acid Catabolism Confers a Competitive Advantage to Pathogenic *Vibrio cholerae* in the Mouse Intestine. *Infect. Immun.* 77, 3807–3816.
- Almagro-Moreno, S., and Boyd, E.F. (2009b). Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. *BMC Evol. Biol.* 9, 118.
- Alteri, C.J., Smith, S.N., and Mobley, H.L.T. (2009). Fitness of *Escherichia coli* during Urinary Tract Infection Requires Gluconeogenesis and the TCA Cycle. *PLoS Pathog.* 5, e1000448.
- Ancuta, P., Pedron, T., Girard, R., Sandström, G., and Chaby, R. (1996). Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. *Infect. Immun.* 64, 2041–2046.
- Anda, P., Del Pozo, J.S., Garcia, J.D., Escudero, R., Pena, F.G., Velasco, M.L., Sellek, R.E., Chillarón, M.J., Serrano, L.S., and Navarro, J.M. (2001). Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 575.
- Anthony, L.D., Burke, R.D., and Nano, F.E. (1991). Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. *Infect Immun* 59, 3291–3296.
- Apicella, M.A., Post, D.M., Fowler, A.C., Jones, B.D., Rasmussen, J.A., Hunt, J.R., Imagawa, S., Choudhury, B., Inzana, T.J., Maier, T.M., et al. (2010). Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One* 5, e11060.
- Appelberg, R. (2006). Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol* 79, 1117–1128.

- Asare, R., and Kwaik, Y.A. (2010). Exploitation of host cell biology and evasion of immunity by *Francisella tularensis*. *Front Microbiol* 1, 145.
- Asare, R., Akimana, C., Jones, S., and Abu Kwaik, Y. (2010). Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors. *Env. Microbiol* 12, 2587–2612.
- Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., and Sasakawa, C. (2011). Host-pathogen interactions: Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell Biol.* 195, 931–942.
- Avril JL et al (2000). *Francisella tularensis*. In *Bactériologie Clinique*, (Paris: Ellipse), pp. 374–377.
- Ayers, M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2010). Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiol* 5, 1203–1218.
- Baca, O.G., Roman, M.J., Glew, R.H., Christner, R.F., Buhler, J.E., and Aragon, A.S. (1993). Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infect. Immun.* 61, 4232–4239.
- Bakshi, C.S., Malik, M., Regan, K., Melendez, J.A., Metzger, D.W., Pavlov, V.M., and Sellati, T.J. (2006). Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J Bacteriol* 188, 6443–6448.
- Bakshi, C.S., Malik, M., Mahawar, M., Kirimanjeswara, G.S., Hazlett, K.R.O., Palmer, L.E., Furie, M.B., Singh, R., Melendez, J.A., Sellati, T.J., et al. (2008). An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine* 26, 5276–5288.
- Balagopal, A., MacFarlane, A.S., Mohapatra, N., Soni, S., Gunn, J.S., and Schlesinger, L.S. (2006). Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Infect Immun* 74, 5114–5125.
- Bandara, A.B., Champion, A.E., Wang, X., Berg, G., Apicella, M.A., McLendon, M., Azadi, P., Snyder, D.S., and Inzana, T.J. (2011). Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One* 6, e19003.
- Bannerman, D.D., and Goldblum, S.E. (2003). Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L899–914.
- Barel, M., and Charbit, A. (2013). *Francisella tularensis* intracellular survival: To eat or to die. *Microbes Infect In press*.

- Barel, M., Hovanessian, A.G., Meibom, K., Briand, J.P., Dupuis, M., and Charbit, A. (2008). A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC Microbiol* 8, 145.
- Barel, M., Meibom, K., Dubail, I., Botella, J., and Charbit, A. (2012). *Francisella tularensis* regulates the expression of the amino acid transporter SLC1A5 in infected THP-1 human monocytes. *Cell Microbiol* 14, 1769–1783.
- Barker, J.R., and Klose, K.E. (2007). Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Acad Sci* 1105, 138–159.
- Barker, J.R., Chong, A., Wehrly, T.D., Yu, J.J., Rodriguez, S.A., Liu, J., Celli, J., Arulanandam, B.P., and Klose, K.E. (2009). The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol Microbiol* 74, 1459–1470.
- Baron, G.S. (1996). Characterization and Sequencing of a Respiratory Burst-inhibiting Acid Phosphatase from *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.* 271, 10973–10983.
- Baron, G.S., and Nano, F.E. (1998). MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* 29, 247–259.
- Baron, G.S., and Nano, F.E. (1999). An erythromycin resistance cassette and mini-transposon for constructing transcriptional fusions to cat. *Gene* 229, 59–65.
- Barth, A.L., and Pitt, T.L. (1996). The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 45, 110–119.
- Bauerfeind, P., Garner, R.M., and Mobley, L.T. (1996). Allelic exchange mutagenesis of nixA in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. *Infect. Immun.* 64, 2877–2880.
- Beckstrom-Sternberg, S.M., Auerbach, R.K., Godbole, S., Pearson, J.V., Beckstrom-Sternberg, J.S., Deng, Z., Munk, C., Kubota, K., Zhou, Y., Bruce, D., et al. (2007). Complete Genomic Characterization of a Pathogenic A.II Strain of *Francisella tularensis* Subspecies tularensis. *PLoS ONE* 2, e947.
- Bell, B.L., Mohapatra, N.P., and Gunn, J.S. (2010). Regulation of virulence gene transcripts by the *Francisella novicida* orphan response regulator PmrA: role of phosphorylation and evidence of MglA/SspA interaction. *Infect Immun* 78, 2189–2198.
- Benlyazid, A., Lescanne, E., Borderon, J.C., and Ployet, M.J. (1997). Manifestations cervico-faciales de la tularémie. A propos d'un cas familial. In *Annales d'Otolaryngologie et de*



- Chirurgie Cervico Faciale, pp. 80–83.
- Bercovier, H., and H. H. Mollaret (1984). *Yersinia*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Baltimore: The Williams & Wilkins Co), pp. 503–506.
- Bliska, J.B., and Casadevall, A. (2008). Intracellular pathogenic bacteria and fungi — a case of convergent evolution? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 165–171.
- Bonquist, L., Lindgren, H., Golovliov, I., Guina, T., and Sjöstedt, A. (2008). MglA and Igl Proteins Contribute to the Modulation of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain-Containing Phagosomes in Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 76, 3502–3510.
- Bönquist, L., Lindgren, H., Golovliov, I., Guina, T., and Sjöstedt, A. (2008). MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect Immun* 76, 3502–3510.
- Brevik, Ø., Ottem, K.F., Kamaishi, T., Watanabe, K., and Nylund, A. (2011). *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1044–1056.
- Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Bystrom, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., and Forsman, M. (2003a). Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2924–2931.
- Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Bystrom, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., and Forsman, M. (2003b). Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol* 41, 2924–2931.
- Broms, J.E., Sjöstedt, A., and Lavander, M. (2010). The Role of the *Francisella tularensis* Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Front Microbiol* 1, 136.
- Broms, J.E., Lavander, M., Meyer, L., and Sjöstedt, A. (2011). IglG and IglI of the *Francisella* pathogenicity island are important virulence determinants of *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 79, 3683–3696.
- Broms, J.E., Meyer, L., Sun, K., Lavander, M., and Sjöstedt, A. (2012). Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection. *PLoS One* 7, e50473.
- Brotcke, A., and Monack, D.M. (2008). Identification of *fevR*, a novel regulator of virulence

- gene expression in *Francisella novicida*. *Infect Immun* 76, 3473–3480.
- Brotcke, A., Weiss, D.S., Kim, C.C., Chain, P., Malfatti, S., Garcia, E., and Monack, D.M. (2006). Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 74, 6642–6655.
- Brown, L.M. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22, 283–297.
- De Bruin, O.M., Ludu, J.S., and Nano, F.E. (2007). The *Francisella* pathogenicity island protein IglA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiol* 7, 1.
- Bryant KA (2002). Tularemia: lymphadenitis with a twist. *Pediatr Ann* 31, 187–190.
- Buchan, B.W., McCaffrey, R.L., Lindemann, S.R., Allen, L.A., and Jones, B.D. (2009). Identification of migR, a regulatory element of the *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain iglABCD virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages. *Infect Immun*.
- Burke, D.S. (1977). Immunization against Tularemia: Analysis of the Effectiveness of Live *Francisella tularensis* Vaccine in Prevention of Laboratory-Acquired Tularemia. *J. Infect. Dis.* 135, 55–60.
- Byrd, T.F., and Horwitz, M.A. (1989). Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J. Clin. Invest.* 83, 1457.
- Bystrom, M., Bocher, S., Magnusson, A., Prag, J., and Johansson, A. (2005). Tularemia in Denmark: Identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Strain by Real-Time PCR and High-Resolution Typing by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5355–5358.
- Caipang, C., Kulkarni, A., Brinchmann, M.F., Korsnes, K., and Kiron, V. (2010). Detection of *Francisella piscicida* in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. *Vet. J.* 184, 357–361.
- Candela, T., and Fouet, A. (2005). *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 57, 717–726.
- Candela, T., and Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* 60, 1091–1098.
- Carrero, J.A., Calderon, B., and Unanue, E.R. (2004). Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* Is a Lymphocyte Apoptogenic Molecule. *J. Immunol.* 172, 4866–4874.

- Case, E.D.R., Chong, A., Wehrly, T.D., Hansen, B., Child, R., Hwang, S., Virgin, H.W., and Celli, J. (2014). The *Francisella* O-antigen mediates survival in the macrophage cytosol via autophagy avoidance: *Francisella* avoidance of autophagy. *Cell. Microbiol.* 16, 862–877.
- Cerny Z (2001). Changes of the epidemiology and the clinical picture of tularemia in Southern Moravia (the Czech Republic) during the period 1936-1999. *Eur J Epidemiol* 17, 637–642.
- Chakraborty, S., Monfett, M., Maier, T.M., Benach, J.L., Frank, D.W., and Thanassi, D.G. (2008). Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect Immun* 76, 2852–2861.
- Chamberlain, R.E. (1965). Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol* 13, 232–235.
- Chambers, J.R., and Bender, K.S. (2011). The RNA chaperone Hfq is important for growth and stress tolerance in *Francisella novicida*. *PLoS One* 6, e19797.
- Champion, M.D., Zeng, Q., Nix, E.B., Nano, F.E., Keim, P., Kodira, C.D., Borowsky, M., Young, S., Koehrsen, M., Engels, R., et al. (2009). Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog* 5, e1000459.
- Charity, J.C., Costante-Hamm, M.M., Balon, E.L., Boyd, D.H., Rubin, E.J., and Dove, S.L. (2007). Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 3, e84.
- Charity, J.C., Blalock, L.T., Costante-Hamm, M.M., Kasper, D.L., and Dove, S.L. (2009). Small molecule control of virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 5, e1000641.
- Chatfield, S., Roberts, M., Li, J., Starns, A., and Dougan, G. (1994). The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *Dev. Biol. Stand.* 82, 35–42.
- Chatfield, S.N., Roberts, M., Dougan, G., Hormaeche, C., and Khan, C.M.A. (1995). The development of oral vaccines against parasitic diseases utilizing live attenuated *Salmonella*. *Parasitology* 110, S17.
- Chaudhuri, R.R., Ren, C.-P., Desmond, L., A. Vincent, G., Silman, N.J., Brehm, J.K., Elmore, M.J., Hudson, M.J., Forsman, M., Isherwood, K.E., et al. (2007). Genome Sequencing Shows that European Isolates of *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* Are Almost Identical to US Laboratory Strain Schu S4. *PLoS ONE* 2, e352.
- Checroun, C., Wehrly, T.D., Fischer, E.R., Hayes, S.F., and Celli, J. (2006). Autophagy-

- mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 14578–14583.
- Chen, I., and Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* *2*, 241–249.
- Chen, D.E., Podell, S., Sauer, J.D., Swanson, M.S., and Saier, M.H.J. (2008). The phagosomal nutrient transporter (Pht) family. *Microbiology* *154*, 42–53.
- Cherwonogrodzky, J.W., Knodel, M.H., and Spence, M.R. (1994). Increased encapsulation and virulence of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) by subculturing on synthetic medium. *Vaccine* *12*, 773–775.
- Chong, A., and Celli, J. (2010). The francisella intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front Microbiol* *1*, 138.
- Chong, A., Wehrly, T.D., Nair, V., Fischer, E.R., Barker, J.R., Klose, K.E., and Celli, J. (2008). The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and Francisella pathogenicity island protein expression. *Infect Immun* *76*, 5488–5499.
- Chong, A., Wehrly, T.D., Child, R., Hansen, B., Hwang, S., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy* *8*, 1342–1356.
- Christenson, B. (1984). An Outbreak of Tularemia in the Northern Part of Central Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* *16*, 285–290.
- Christiansen, J.K., Nielsen, J.S., Ebersbach, T., Valentin-Hansen, P., Sogaard-Andersen, L., and Kallipolitis, B.H. (2006). Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. *Rna* *12*, 1383–1396.
- Christopher, G.W., Cieslak, T.J., Pavlin, J.A., and Eitzen, E.M., Jr (1997). Biological warfare. A historical perspective. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *278*, 412–417.
- Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (2007). Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Acad Sci* *1105*, 160–186.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2004). Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* *72*, 3204–3217.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2005). *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* *73*, 5892–5902.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2009). *Francisella tularensis* phagosomal

- escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun* 77, 1757–1773.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011.
- Collins, H.L. (2003). The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol. Lett.* 85, 193–195.
- Colotta, F., Saccani, S., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Introna, M., and Mantovani, A. (1996). Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 2534–2541.
- Cover, T.L., and Blaser, M.J. (2009). *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology* 136, 1863–1873.
- Czerny Z, Privorova A, Samek J, and Slezingr J (1982). Epidemie alimentarni cestou ziskane tularemie v domove duchodcu. *CS Epidem* 31, 221–231.
- D’Argenio, D.A., Wu, M., Hoffman, L.R., Kulasekara, H.D., Déziel, E., Smith, E.E., Nguyen, H., Ernst, R.K., Larson Freeman, T.J., Spencer, D.H., et al. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 64, 512–533.
- Dai, S., Mohapatra, N.P., Schlesinger, L.S., and Gunn, J.S. (2011). Regulation of *Francisella tularensis* Virulence. *Front. Microbiol.* 1.
- Deng, K., Blick, R.J., Liu, W., and Hansen, E.J. (2006). Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun* 74, 4224–4236.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* 124, 677–688.
- Ding, Y., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2004). Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol* 53, 345–354.
- Van der Does, A.M., Beekhuizen, H., Ravensbergen, B., Vos, T., Ottenhoff, T.H.M., van Dissel, J.T., Drijfhout, J.W., Hiemstra, P.S., and Nibbering, P.H. (2010). LL-37 Directs Macrophage Differentiation toward Macrophages with a Proinflammatory Signature. *J. Immunol.* 185, 1442–1449.
- Dorofe’ev, K. A. Classification of the causative agent of tularemia.
- Dowling, J.N., Saha, A.K., and Glew, R.H. (1992). Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiol. Rev.* 56, 32–60.
- Dr Cavallini La tularémie : une zoonose d’actualité.

- Drevets, D.A., and Bronze, M.S. (2008). *Listeria monocytogenes* : epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53, 151–165.
- Eicher, T., Cha, H.J., Seeger, M.A., Brandstatter, L., El-Delik, J., Bohnert, J.A., Kern, W.V., Verrey, F., Grutter, M.G., Diederichs, K., et al. (2012). Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. Proc Natl Acad Sci U A 109, 5687–5692.
- EIGELSBACH, H.T., and DOWNS, C.M. (1961). Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. J. Immunol. Baltim. Md 1950 87, 415–425.
- El'bert B.I, I. S. T., and T.I. Puchekeva (1947). The cutaneous method of the specific prophylaxis of tularemia. Rostov 7–20.
- Eliasson, H., Lindback, J., Nuorti, J.P., Arneborn, M., Giesecke, J., and Tegnell, A. (2002). The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. Emerg. Infect. Dis. 8, 956–960.
- Eliasson, H., Sjöstedt, A., and Bäck, E. (2005). Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularaemia. Scand. J. Infect. Dis. 37, 833–837.
- Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., and Titball, R.W. (2002). Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 15, 631–646.
- Estavoyer, J., Couetdic, G., and Leroy J et al (1993). Tularemie. In Encyclopédie Médicale Chirurgicale Des Maladies Infectieuses, pp. 8–035–F–10, 8p.
- Euseby JP Dict. Bactériologie Vét. Line.
- Feldman, K.A., Ensore, R.E., Lathrop, S.L., Matyas, B.T., McGuill, M., Schriefer, M.E., Stiles-Enos, D., Dennis, D.T., Petersen, L.R., and Hayes, E.B. (2001). An Outbreak of Primary Pneumonic Tularemia on Martha's Vineyard. N. Engl. J. Med. 345, 1601–1606.
- Feldman, K.A., Stiles-Enos, D., Julian, K., Matyas, B.T., Telford, S.R., Chu, M.C., Petersen, L.R., and Hayes, E.B. (2003). Tularemia on Martha's Vineyard: Seroprevalence and Occupational Risk. Emerg. Infect. Dis. 9, 350–354.
- Feldman KA (2003). Tularemia. J Am Vet Med Assoc 222, 725–730.
- Fernandes Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. Nat Immunol 11, 385–393.
- Flannagan, R.S., Cosío, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of

- phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 355–366.
- Follmer, C. (2010). Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J. Clin. Pathol.* 63, 424–430.
- Fonseca, M.V., Sauer, J.-D., Crepin, S., Byrne, B., Swanson, M.S., and Camilli, A. (2014). The phtC-phtD Locus Equips *Legionella pneumophila* for Thymidine Salvage and Replication in Macrophages. *Infect. Immun.* 82, 720–730.
- Forbes, J.R., and Gros, P. (2001). Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host–pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 9, 397–403.
- Forslund, A.L., Kuoppa, K., Svensson, K., Salomonsson, E., Johansson, A., Bystrom, M., Oyston, P.C., Michell, S.L., Titball, R.W., Noppa, L., et al. (2006). Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol Microbiol* 59, 1818–1830.
- Forslund, A.L., Salomonsson, E.N., Golovliov, I., Kuoppa, K., Michell, S., Titball, R., Oyston, P., Noppa, L., Sjostedt, A., and Forsberg, A. (2010). The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies tularensis. *BMC Microbiol* 10, 227.
- Forsman, M., SANDSTRÖM, G., and SJÖSTEDT, A. (1994). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 38–46.
- Fouque, E., Trouilhe, M.-C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.-H., and Hechard, Y. (2012). Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. *Eukaryot. Cell* 11, 382–387.
- Franco, R., Schoneveld, O.J., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2007). The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem* 113, 234–258.
- Franke, J., and Kessin, R. (1977). A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2157.
- Frischknecht, F. (2003). The history of biological warfare. *EMBO Rep.* 4, S47–S52.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, S.J., and Wood, N.D. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes†. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 120–126.
- Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin Cancer Biol* 15, 254–266.
- Fulop, M., Leslie, D., and Titball, R. (1996). A rapid, highly sensitive method for the

- detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 364–366.
- Galen, J.E., Ketley, J.M., Fasano, A., Richardson, S.H., Wasserman, S.S., and Kaper, J.B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infect. Immun.* 60, 406–415.
- Gil, H., Benach, J.L., and Thanassi, D.G. (2004). Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 72, 3042–3047.
- Gil, H., Platz, G.J., Forestal, C.A., Monfett, M., Bakshi, C.S., Sellati, T.J., Furie, M.B., Benach, J.L., and Thanassi, D.G. (2006). Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc Natl Acad Sci U A* 103, 12897–12902.
- Golovliov, I., Ericsson, M., Sandström, G., Tärnvik, A., and Sjöstedt, A. (1997). Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect. Immun.* 65, 2183–2189.
- Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H., and Sjöstedt, A. (2003). An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* 71, 5940–5950.
- Golubić, D., and Zember, S. (2001). Dual infection: tularemia and Lyme borreliosis acquired by single tick bite in northwest Croatia. *Acta Medica Croat. Časopis Hrvatske Akad. Med. Znan.* 55, 207–209.
- Goswami, T., BHATTACHARJEE, A., BABAL, P., SEARLE, S., MOORE, E., LI, M., and Blackwell, J. (2001). Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochem J* 354, 511–519.
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Bottai, D., Levillain, F., Dumas, A., Wallach, J.B., Caire-Brandli, I., de Chastellier, C., Wu, T.-D., Poincloux, R., et al. (2014). Mycobacterium tuberculosis Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection. *PLoS Pathog.* 10, e1003928.
- Govan, J.R., and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539–574.
- Grasemann, H., Ioannidis, I., Tomkiewicz, R.P., de Groot, H., Rubin, B.K., and Ratjen, F. (1998). Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch. Dis. Child.* 78, 49–53.
- Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K.K., and Nano, F.E. (2002). The identification of five



- genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215, 53–56.
- Greco, D., Allegrini, G., Tizzi, T., Ninu, E., Lamanna, A., and Luzi, S. (1987). A waterborne tularemia outbreak. *Eur. J. Epidemiol.* 3, 35–38.
- Griffith, O.W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27, 922–935.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., and Terán, L.M. (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 135, 1–11.
- Guina, T., Radulovic, D., Bahrami, A.J., Bolton, D.L., Rohmer, L., Jones-Isaac, K.A., Chen, J., Gallagher, L.A., Gallis, B., Ryu, S., et al. (2007). MglA regulates *Francisella tularensis* subsp. *novicida* (*Francisella novicida*) response to starvation and oxidative stress. *J Bacteriol* 189, 6580–6586.
- Gunn, J.S., and Ernst, R.K. (2007). The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann N Acad Sci* 1105, 202–218.
- Gutierrez, M.G., and Colombo, M.I. (2005). Autophagosomes: a fast-food joint for unexpected guests. *Autophagy* 1, 179–181.
- Haas, A. (1998). Reprogramming the phagocytic pathway--intracellular pathogens and their vacuoles (review). *Mol. Membr. Biol.* 15, 103–121.
- Hager, A.J., Bolton, D.L., Pelletier, M.R., Brittnacher, M.J., Gallagher, L.A., Kaul, R., Skerrett, S.J., Miller, S.I., and Guina, T. (2006). Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol* 62, 227–237.
- Hajjar, A.M., Harvey, M.D., Shaffer, S.A., Goodlett, D.R., Sjostedt, A., Edebro, H., Forsman, M., Bystrom, M., Pelletier, M., Wilson, C.B., et al. (2006). Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun* 74, 6730–6738.
- Hancock, R.E., and Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8, 402–410.
- Hansson, C., and Ingvarsson, T. (2002). Two Cases of Tularaemia after an Orienteering Contest on the Non-endemic Island of Bornholm. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 76–76.
- Harris, S. (1992). Japanese Biological Warfare Research on Humans: A Case Study of Microbiology and Ethics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 666, 21–52.
- Hartley, G., Taylor, R., Prior, J., Newstead, S., Hitchen, P.G., Morris, H.R., Dell, A., and Titball, R.W. (2006). Grey variants of the live vaccine strain of *Francisella tularensis*

- lack lipopolysaccharide O-antigen, show reduced ability to survive in macrophages and do not induce protective immunity in mice. *Vaccine* 24, 989–996.
- Hensel, M. (2000). Salmonella pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36, 1015–1023.
- Higgins, J.A., Hubalek, Z., Halouzka, J., Elkins, K.L., Sjøstedt, A., Shipley, M., and Ibrahim, M.S. (2000). Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 310–318.
- Hilbi, H. (2006). Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell. Microbiol.* 8, 1697–1706.
- Hiron, A., Posteraro, B., Carrière, M., Remy, L., Delporte, C., La Sorda, M., Sanguinetti, M., Juillard, V., and Borezée-Durant, E. (2010). A nickel ABC-transporter of *Staphylococcus aureus* is involved in urinary tract infection: Nickel uptake and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 77, 1246–1260.
- Hoffman, L.R., Richardson, A.R., Houston, L.S., Kulasekara, H.D., Martens-Habben, W., Klausen, M., Burns, J.L., Stahl, D.A., Hassett, D.J., Fang, F.C., et al. (2010). Nutrient Availability as a Mechanism for Selection of Antibiotic Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* within the CF Airway. *PLoS Pathog.* 6, e1000712.
- Hoiseth, S.K., and Stocker, B.A.D. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238–239.
- Holland, I.B., Schmitt, L., and Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* 22, 29–39.
- Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., Wenger, J.D., Moss, C.W., and Brenner, D.J. (1989). *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1601–1608.
- Holt, K.E., Thomson, N.R., Wain, J., Langridge, G.C., Hasan, R., Bhutta, Z.A., Quail, M.A., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., et al. (2009). Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10, 36.
- Honn, M., Lindgren, H., and Sjöstedt, A. (2012). The role of MglA for adaptation to oxidative stress of *Francisella tularensis* LVS. *BMC Microbiol.* 12, 14.
- Horzempa, J., Carlson, P.E.J., O'Dee, D.M., Shanks, R.M., and Nau, G.J. (2008). Global transcriptional response to mammalian temperature provides new insight into *Francisella tularensis* pathogenesis. *BMC Microbiol* 8, 172.
- Horzempa, J., O'Dee, D.M., Stolz, D.B., Franks, J.M., Clay, D., and Nau, G.J. (2011).

- Invasion of Erythrocytes by *Francisella tularensis*. *J. Infect. Dis.* 204, 51–59.
- Huber, B., Escudero, R., Busse, H.-J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kämpfer, P., and Splettstoesser, W.D. (2010). Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1887–1896.
- Huynh, K.K., and Grinstein, S. (2007). Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 71, 452–462.
- Imlay, J.A. (2003). PATHWAYS OF OXIDATIVE DAMAGE. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395–418.
- Ingalls, C.S., and Brent, M.M. (1983). Defined minimal growth medium for *Acanthamoeba polyphaga*. *J. Protozool.* 30, 606–608.
- Ireton, K., and Cossart, P. (1997). Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annu. Rev. Genet.* 31, 113–138.
- Ishihama, A., and Saitoh, T. (1979). Subunits of RNA polymerase in function and structure IX. Regulation of RNA polymerase activity by stringent starvation protein (SSP). *J Mol Biol* 129, 517–530.
- Izadpanah, A., and Gallo, R.L. (2005). Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52, 381–390; quiz 391–392.
- Jabado, N. (2000). Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* 192, 1237–1248.
- Jellison, W. L. (1950). Tularemia; geographical distribution of deerfly fever and the biting fly, *Chrysops discalis* Williston. *Public health Rep.* 1321–1329.
- Jenkins, A., Cote, C., Twenhafel, N., Merkel, T., Bozue, J., and Welkos, S. (2011). Role of Purine Biosynthesis in *Bacillus anthracis* Pathogenesis and Virulence. *Infect. Immun.* 79, 153–166.
- Jensen, W.I., Owen, C.R., and Jellison, W.L. (1969). *Yersinia philomiragia* sp. n., a new member of the *Pasteurella* group of bacteria, naturally pathogenic for the muskrat (*Ondatra zibethica*). *J. Bacteriol.* 100, 1237–1241.
- Jermyn, W.S., and Boyd, E.F. (2002). Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 3681–3693.
- Johansson, A., Urich, S.K., Chu, M.C., Sjöstedt, A., and Tärnvik, A. (2002). In Vitro

- Susceptibility to Quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 327–330.
- Johansson, A., Farlow, J., Larsson, P., Dukerich, M., Chambers, E., Bystrom, M., Fox, J., Chu, M., Forsman, M., Sjostedt, A., et al. (2004). Worldwide Genetic Relationships among *Francisella tularensis* Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Bacteriol.* 186, 5808–5818.
- Jones, B.D., Faron, M., Rasmussen, J.A., and Fletcher, J.R. (2014). Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Jones, C.L., Napier, B.A., Sampson, T.R., Llewellyn, A.C., Schroeder, M.R., and Weiss, D.S. (2012). Subversion of Host Recognition and Defense Systems by *Francisella* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 383–404.
- Jones, J.W., Kayagaki, N., Broz, P., Henry, T., Newton, K., O'Rourke, K., Chan, S., Dong, J., Qu, Y., Roose-Girma, M., et al. (2010). Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9771–9776.
- Kadzhaev, K., Zingmark, C., Golovliov, I., Bolanowski, M., Shen, H., Conlan, W., and Sjostedt, A. (2009). Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model. *PLoS One* 4, e5463.
- Kantardjiev, T., Ivanov, I., Velinov, T., Padeshki, P., Popov, B., Nenova, R., and Mincheff, M. (2006). Tularemia Outbreak, Bulgaria, 1997–2005. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 678–680.
- Kantardjiev, T., Padeshki, P., and Ivanov, I.N. (2007). Diagnostic approaches for oculoglandular tularemia: advantages of PCR. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 1206–1208.
- Karl F. Ottem, Are Nylund, Egil Karlsbakk, Alice Friis-Møller, Bjørn Krossøy, and Dag Knappskog (2007). New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Arch Microbiol* 188:547–550.
- Kaufmann, A.F., Meltzer, M.I., and Schmid, G.P. (1997). The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? *Emerg. Infect. Dis.* 3, 83–94.
- Kawula, T.H., Hall, J.D., Fuller, J.R., and Craven, R.R. (2004). Use of transposon-transposase complexes to create stable insertion mutant strains of *Francisella tularensis* LVS. *Appl Env. Microbiol* 70, 6901–6904.
- Kirby, J.E. (2004). Anthrax Lethal Toxin Induces Human Endothelial Cell Apoptosis. *Infect. Immun.* 72, 430–439.

- Knodler, L.A., and Celli, J. (2011). Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell Microbiol* 13, 1319–1327.
- Komatsu, N., Oda, T., and Muramatsu, T. (1998). Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. *J. Biochem. (Tokyo)* 124, 1038–1044.
- Kondo, E., Kurata, T., Naigowit, P., and Kanai, K. (1996). Evolution of cell-surface acid phosphatase of *Burkholderia pseudomallei*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 27, 592–599.
- Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G., and Stathopoulos, C. (2005). Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane. *J. Bacteriol.* 187, 4306–4314.
- Kraemer, P.S., Mitchell, A., Pelletier, M.R., Gallagher, L.A., Wasnick, M., Rohmer, L., Brittnacher, M.J., Manoil, C., Skerett, S.J., and Salama, N.R. (2009). Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice. *Infect Immun* 77, 232–244.
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., and Xavier, R.J. (2012). Autophagy and the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 611–646.
- Kulesus, R.R., Diaz-Perez, K., Slechta, E.S., Eto, D.S., and Mulvey, M.A. (2008). Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76, 3019–3026.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., and Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490.
- Lai, X.H., and Sjostedt, A. (2003). Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun* 71, 4642–4646.
- Lai, X.H., Golovliov, I., and Sjostedt, A. (2001). *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 69, 4691–4694.
- Lai, X.H., Golovliov, I., and Sjostedt, A. (2004). Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 37, 225–230.
- Lai, X.H., Shirley, R.L., Crosa, L., Kanistanon, D., Tempel, R., Ernst, R.K., Gallagher, L.A., Manoil, C., and Heffron, F. (2010). Mutations of *Francisella novicida* that alter the mechanism of its phagocytosis by murine macrophages. *PLoS One* 5, e11857.
- Langton Hewer, S.C., and Smyth, A.R. (2009). Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. In *Cochrane Database of*

- Systematic Reviews, The Cochrane Collaboration, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd),.
- Larson, C.L., Wicht, W., and Jellison, W.L. (1955). A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.* 70, 253.
- Larsson, P., Oyston, P.C.F., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.-H., Garcia, E., Hälltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., et al. (2005). The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* 37, 153–159.
- Larsson, P., Elfsmark, D., Svensson, K., Wikstrom, P., Forsman, M., Brettin, T., Keim, P., and Johansson, A. (2009). Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog* 5, e1000472.
- Lauriano, C.M., Barker, J.R., Nano, F.E., Arulanandam, B.P., and Klose, K.E. (2003). Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett* 229, 195–202.
- Lauriano, C.M., Barker, J.R., Yoon, S.S., Nano, F.E., Arulanandam, B.P., Hassett, D.J., and Klose, K.E. (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4246–4249.
- Lawley, T.D., Bouley, D.M., Hoy, Y.E., Gerke, C., Relman, D.A., and Monack, D.M. (2008). Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect. Immun.* 76, 403–416.
- Lee, W.L., Harrison, R.E., and Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 5, 1299–1306.
- Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., and Ganz, T. (1993). Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105–128.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., and Turner, R.J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 371–384.
- Lepilleur, B., Schoeny, N., Melin, P., and Bineau, P. A propos d'un cas de tularémie pharyngoganglionnaire après plumage d'un canard. *Ann Biol Clin* 60, 217–220.
- Li, J., Ryder, C., Mandal, M., Ahmed, F., Azadi, P., Snyder, D.S., Pechous, R.D., Zahrt, T., and Inzana, T.J. (2007). Attenuation and protective efficacy of an O-antigen-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS. *Microbiology* 153, 3141–3153.
- Lindgren, H., Stenmark, S., Chen, W., Tarnvik, A., and Sjöstedt, A. (2004). Distinct roles of reactive nitrogen and oxygen species to control infection with the facultative intracellular

- bacterium *Francisella tularensis*. Infect Immun 72, 7172–7182.
- Lindgren, H., Shen, H., Zingmark, C., Golovliov, I., Conlan, W., and Sjostedt, A. (2007). Resistance of *Francisella* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. Infect Immun.
- Liu, P.T. (2006). Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. Science 311, 1770–1773.
- Liu, P.T., Stenger, S., Tang, D.H., and Modlin, R.L. (2007). Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. J. Immunol. Baltim. Md 1950 179, 2060–2063.
- Llewellyn, A.C., Jones, C.L., Napier, B.A., Bina, J.E., and Weiss, D.S. (2011). Macrophage replication screen identifies a novel *Francisella* hydroperoxide resistance protein involved in virulence. PLoS One 6, e24201.
- Lopez, C.A., Winter, S.E., Rivera-Chavez, F., Xavier, M.N., Poon, V., Nuccio, S.-P., Tsois, R.M., and Baumler, A.J. (2012). Phage-Mediated Acquisition of a Type III Secreted Effector Protein Boosts Growth of *Salmonella* by Nitrate Respiration. mBio 3, e00143–12–e00143–12.
- Ludu, J.S., de Bruin, O.M., Duplantis, B.N., Schmerk, C.L., Chou, A.Y., Elkins, K.L., and Nano, F.E. (2008). The *Francisella* pathogenicity island protein PdpD is required for full virulence and associates with homologues of the type VI secretion system. J Bacteriol 190, 4584–4595.
- Lundquist, M., Caspersen, M.B., Wikstrom, P., and Forsman, M. (2005). Discrimination of *Francisella tularensis* subspecies using surface enhanced laser desorption ionization mass spectrometry and multivariate data analysis. FEMS Microbiol Lett 243, 303–310.
- Machado, J. (2002). Tularemia. Okla Dtate Med Assoc 65, 671–673.
- Maier, T.M., Casey, M.S., Becker, R.H., Dorsey, C.W., Glass, E.M., Maltsev, N., Zahrt, T.C., and Frank, D.W. (2007). Identification of *Francisella tularensis* Himar1-based transposon mutants defective for replication in macrophages. Infect Immun 75, 5376–5389.
- Mailles, A., and Vaillant, V. (2005). La surveillance de la tularémie chez l’homme en France: description des cas déclarés en 2003 et 2004 et recommandations pour l’investigation des cas sporadiques et groupés. Inst. Veille Sanit.
- Mailles, A., and Vaillant, V. Bilan de 10 années de surveillance de la tularémie chez l’Homme en France.
- Marchette, N.J., and Nicholes, P.S. (1961). Virulence and citrulline ureidase activity of

- Pasteurella tularensis*. J. Bacteriol. 82, 26–32.
- Mariathasen, S., Weiss, D.S., Dixit, V.M., and Monack, D.M. (2005). Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. J Exp Med 202, 1043–1049.
- Markova, N., Kussovski, V., and Radoucheva, T. (1998). Killing of *Pseudomonas pseudomallei* by Polymorphonuclear Leukocytes and Peritoneal Macrophages from Chicken, Sheep, Swine and Rabbits. Zentralblatt Für Bakteriologie 288, 103–110.
- Markowitz LE, Hynes NA, De La Cruz P, Campos E, Barbaree JM, Plikaytis BD, Mosier D, and Kaufmann AF (1985). Tick-borne tularemia. An outbreak of lymphadenopathy in children. JAMA 254, 2922–2925.
- Marohn, M.E., Santiago, A.E., Shirey, K.A., Lipsky, M., Vogel, S.N., and Barry, E.M. (2012). Members of the *Francisella tularensis* phagosomal transporter subfamily of major facilitator superfamily transporters are critical for pathogenesis. Infect Immun 80, 2390–2401.
- Martineau, A.R., Wilkinson, K.A., Newton, S.M., Floto, R.A., Norman, A.W., Skolimowska, K., Davidson, R.N., Sørensen, O.E., Kampmann, B., Griffiths, C.J., et al. (2007). IFN- $\gamma$ - and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. J. Immunol. Baltim. Md 1950 178, 7190–7198.
- Matyas, B.T., Nieder, H.S., and Telford, S.R. (2007). Pneumonic Tularemia on Martha's Vineyard: Clinical, Epidemiologic, and Ecological Characteristics. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1105, 351–377.
- Maurelli, A.T., Fernández, R.E., Bloch, C.A., Rode, C.K., and Fasano, A. (1998). “Black holes” and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 3943–3948.
- McCaffrey, R.L., and Allen, L.A. (2006). *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. J Leukoc Biol 80, 1224–1230.
- McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B.D., and Allen, L.A. (2010). Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. J Leukoc Biol 88, 791–805.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., et al. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413, 852–856.



- McLendon, M.K., Apicella, M.A., and Allen, L.-A.H. (2006). *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 167–185.
- Meibom, K.L., and Charbit, A. (2010). *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence. *Front Microbiol* 1, 140.
- Meibom, K.L., Forslund, A.L., Kuoppa, K., Alkhuder, K., Dubail, I., Dupuis, M., Forsberg, A., and Charbit, A. (2009). Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 77, 1866–1880.
- Melillo, A.A., Mahawar, M., Sellati, T.J., Malik, M., Metzger, D.W., Melendez, J.A., and Bakshi, C.S. (2009). Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J Bacteriol* 191, 6447–6456.
- Méndez-Samperio, P. (2008). Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections. *Peptides* 29, 1836–1841.
- Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D., and Aderem, A. (2010). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11, 1136–1142.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728–741.
- Mohapatra, N.P., Soni, S., Bell, B.L., Warren, R., Ernst, R.K., Muszynski, A., Carlson, R.W., and Gunn, J.S. (2007). Identification of an Orphan Response Regulator Required for the Virulence of *Francisella* spp. and Transcription of Pathogenicity Island Genes. *Infect Immun* 75, 3305–3314.
- Mohapatra, N.P., Soni, S., Reilly, T.J., Liu, J., Klose, K.E., and Gunn, J.S. (2008). Combined deletion of four *Francisella novicida* acid phosphatases attenuates virulence and macrophage vacuolar escape. *Infect Immun* 76, 3690–3699.
- Mohapatra, N.P., Soni, S., Rajaram, M.V., Dang, P.M., Reilly, T.J., El-Benna, J., Clay, C.D., Schlesinger, L.S., and Gunn, J.S. (2010). *Francisella* acid phosphatases inactivate the NADPH oxidase in human phagocytes. *J Immunol* 184, 5141–5150.
- Molins, C.R., Delorey, M.J., Yockey, B.M., Young, J.W., Sheldon, S.W., Reese, S.M., Schriefer, M.E., and Petersen, J.M. (2010). Virulence Differences Among *Francisella tularensis* Subsp. *tularensis* Clades in Mice. *PLoS ONE* 5, e10205.
- Moore, R.A., Reckseidler-Zenteno, S., Kim, H., Nierman, W., Yu, Y., Tuanyok, A., Warawa, J., DeShazer, D., and Woods, D.E. (2004). Contribution of Gene Loss to the Pathogenic

- Evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Infect. Immun.* 72, 4172–4187.
- Moule, M.G., Monack, D.M., and Schneider, D.S. (2010). Reciprocal analysis of *Francisella novicida* infections of a *Drosophila melanogaster* model reveal host-pathogen conflicts mediated by reactive oxygen and imd-regulated innate immune response. *PLoS Pathog* 6, e1001065.
- Naderer, T., Ellis, M.A., Sernee, M.F., De Souza, D.P., Curtis, J., Handman, E., and McConville, M.J. (2006). Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5502–5507.
- Nairz, M., Theurl, I., Ludwiczek, S., Theurl, M., Mair, S.M., Fritsche, G., and Weiss, G. (2007). The co-ordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular *Salmonella typhimurium*. *Cell. Microbiol.* 9, 2126–2140.
- Nano, F.E., and Schmerk, C. (2007). The *Francisella* pathogenicity island. *Ann N Acad Sci* 1105, 122–137.
- Nano, F.E., Zhang, N., Cowley, S.C., Klose, K.E., Cheung, K.K.M., Roberts, M.J., Ludu, J.S., Letendre, G.W., Meierovics, A.I., Stephens, G., et al. (2004). A *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *J. Bacteriol.* 186, 6430–6436.
- Napier, B.A., Meyer, L., Bina, J.E., Miller, M.A., Sjostedt, A., and Weiss, D.S. (2012). Link between intraphagosomal biotin and rapid phagosomal escape in *Francisella*. *Proc Natl Acad Sci U A* 109, 18084–18089.
- Nickel, D., Busch, M., Mayer, D., Hagemann, B., Knoll, V., and Stenger, S. (2012). Hypoxia Triggers the Expression of Human Defensin 2 and Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* in Human Macrophages. *J. Immunol.* 188, 4001–4007.
- Niu, H., Yamaguchi, M., and Rikihisa, Y. (2008). Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 10, 593–605.
- Niu, H., Xiong, Q., Yamamoto, A., Hayashi-Nishino, M., and Rikihisa, Y. (2012). Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proc Natl Acad Sci U A* 109, 20800–20807.
- Nolan, K.J. (2002). In Vivo Behavior of a *Helicobacter pylori* SS1 nixA Mutant with Reduced Urease Activity. *Infect. Immun.* 70, 685–691.
- Nunes, P., Demarex, N., and Dinauer, M.C. (2013). Regulation Of The NADPH Oxidase

- And Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. Traffic n/a–n/a.
- Office international des épizooties, Acha, P.N., and Szyfres, B. (2005). Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume I, Volume I, (Paris: OIE).
- Ohman, D.E., and Chakrabarty, A.M. (1982). Utilization of human respiratory secretions by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* of cystic fibrosis origin. *Infect. Immun.* 37, 662–669.
- Olsufjev NG, EMELYANOVA OS, and DUNAYEVA TN (1959). Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 3:138–49.
- Olsufjev NG. (1970). Olsufjev, N. G. 1970. Taxonomy and characteristic of the genus *Francisella* Dorofeev, 1947. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 14: 67-74. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 14(1):67–74.
- Omsland, A., Sixt, B.S., Horn, M., and Hackstadt, T. (2014). Chlamydial metabolism revisited: interspecies metabolic variability and developmental stage-specific physiologic activities. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., and Kamaishi, T. (2009). Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al.(2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov.[syn. *Francisella piscicida* Ottem et al.(2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1231–1243.
- Ottem, K. F (2007). Characterization of *Francisella* sp., GM2212, the first *Francisella* isolate from marine fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Arch Microbiol* 187: 343– 5.
- Ouellette, S.P., Dorsey, F.C., Moshia, S., Cleveland, J.L., and Carabeo, R.A. (2011). Chlamydia Species-Dependent Differences in the Growth Requirement for Lysosomes. *PLoS ONE* 6, e16783.
- Palmer, K.L., Brown, S.A., and Whiteley, M. (2007). Membrane-Bound Nitrate Reductase Is Required for Anaerobic Growth in Cystic Fibrosis Sputum. *J. Bacteriol.* 189, 4449–4455.
- Pandya, G.A., Holmes, M.H., Petersen, J.M., Pradhan, S., Karamycheva, S.A., Wolcott, M.J., Molins, C., Jones, M., Schrieffer, M.E., Fleischmann, R.D., et al. (2009). Whole genome single nucleotide polymorphism based phylogeny of *Francisella tularensis* and its application to the development of a strain typing assay. *BMC Microbiol.* 9, 213.
- Paradkar, P.N., De Domenico, I., Durchfort, N., Zohn, I., Kaplan, J., and Ward, D.M. (2008). Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood* 112, 866–874.
- Paretsky, D. (1990). The biology of *Coxiella burnetii* and the pathobiochemistry of Q fever and its endotoxigenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 416–421.

- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., et al. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413, 523–527.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., et al. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 35, 32–40.
- De Pascalis, R., Chou, A.Y., Bosio, C.M., Huang, C.-Y., Follmann, D.A., and Elkins, K.L. (2012). Development of Functional and Molecular Correlates of Vaccine-Induced Protection for a Model Intracellular Pathogen, *F. tularensis* LVS. *PLoS Pathog.* 8, e1002494.
- Pechous, R., Celli, J., Penoske, R., Hayes, S.F., Frank, D.W., and Zahrt, T.C. (2006). Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* 74, 4452–4461.
- Pechous, R.D., McCarthy, T.R., and Zahrt, T.C. (2009). Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 684–711.
- Peng, K., and Monack, D.M. (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *Francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun* 78, 2723–2733.
- Pérez-Castrillón, J.L., Bachiller-Luque, P., Martín-Luquero, M., Mena-Martín, F.J., and Herreros, V. (2001). Tularemia Epidemic in Northwestern Spain: Clinical Description and Therapeutic Response. *Clin. Infect. Dis.* 33, 573–576.
- Petersen, J.M., Schriefer, M.E., Carter, L.G., Zhou, Y., Sealy, T., Bawiec, D., Yockey, B., Urich, S., Zeidner, N.S., Avashia, S., et al. (2004). Laboratory Analysis of Tularemia in Wild-Trapped, Commercially Traded Prairie Dogs, Texas, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 419–425.
- Petrosino, J.F., Xiang, Q., Karpathy, S.E., Jiang, H., Yerrapragada, S., Liu, Y., Gioia, J., Hemphill, L., Gonzalez, A., Raghavan, T.M., et al. (2006). Chromosome Rearrangement and Diversification of *Francisella tularensis* Revealed by the Type B (OSU18) Genome Sequence. *J. Bacteriol.* 188, 6977–6985.
- Pierini, R., Juruj, C., Perret, M., Jones, C.L., Mangeot, P., Weiss, D.S., and Henry, T. (2012). AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in *Francisella*-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death Differ.*

- Platz, G.J., Bublit, D.C., Mena, P., Benach, J.L., Furie, M.B., and Thanassi, D.G. (2010). A *tolC* mutant of *Francisella tularensis* is hypercytotoxic compared to the wild type and elicits increased proinflammatory responses from host cells. *Infect Immun* 78, 1022–1031.
- Price, C.T., Al-Quadan, T., Santic, M., Rosenshine, I., and Abu Kwaik, Y. (2011). Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* 334, 1553–1557.
- Price, C.T.D., Richards, A.M., Von Dwingelo, J.E., Samara, H.A., and Abu Kwaik, Y. (2014). Amoeba host- *L. legionella* synchronization of amino acid auxotrophy and its role in bacterial adaptation and pathogenic evolution: Amino acid auxotrophy and pathogenic evolution of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* 16, 350–358.
- Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T.A., and Roth, J.R. (2001). The Alternative Electron Acceptor Tetrathionate Supports B12-Dependent Anaerobic Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on Ethanolamine or 1,2-Propanediol. *J. Bacteriol.* 183, 2463–2475.
- Prior, J.L., Prior, R.G., Hitchen, P.G., Diaper, H., Griffin, K.F., Morris, H.R., Dell, A., and Titball, R.W. (2003). Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *J Med Microbiol* 52, 845–851.
- Pukatzki, S., McAuley, S.B., and Miyata, S.T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* 12, 11–17.
- Qin, A., and Mann, B.J. (2006). Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* tularensis strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol Jul* 31, 69.
- Qu, P.-H., Chen, S.-Y., Scholz, H.C., Busse, H.-J., Gu, Q., Kampfer, P., Foster, J.T., Glaeser, S.P., Chen, C., and Yang, Z.-C. (2013). *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3628–3635.
- Al-Quadan, T., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. (2012). Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol* 20, 299–306.
- Raghunathan, A., Shin, S., and Daefler, S. (2010). Systems approach to investigating host-pathogen interactions in infections with the biothreat agent *Francisella*. Constraints-based model of *Francisella tularensis*. *BMC Syst Biol* 4, 118.
- Rajaram, M.V.S., Butchar, J.P., Parsa, K.V.L., Cremer, T.J., Amer, A., Schlesinger, L.S., and

- Tridandapani, S. (2009). Akt and SHIP Modulate Francisella Escape from the Phagosome and Induction of the Fas-Mediated Death Pathway. *PLoS ONE* 4, e7919.
- Ramakrishnan, G., Meeker, A., and Dragulev, B. (2008). *fslE* is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in *Francisella tularensis* Schu S4. *J Bacteriol* 190, 5353–5361.
- Ramond, E., Gesbert, G., RIGARD, M., DAIROU, J., Dupuis, M., Dubail, I., Meibom, K., Henry, T., Barel, M., and Charbit, A. (2013). Glutamate utilization couples oxidative stress defense and the tricarboxylic acid cycle in Francisella phagosomal escape. *PLoS Pathog.* *In revision*.
- Ramond and Gesbert, Gesbert, G., Barel, M., and Charbit, A. (2012). Proteins involved in *Francisella tularensis* survival and replication inside macrophages. *Future Microbiol* 7, 1255–1268.
- Randow, F., and Münz, C. (2012). Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 33, 475–487.
- Raoult D Dictionnaire de maladies infectieuses. (Paris), pp. 434–435 et 1096–1097.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395–402.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P.J., and Tang, C.M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7, 333–340.
- Reintjes, R. (2002). Tularemia Outbreak Investigation in Kosovo: Case Control and Environmental Studies. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 69–73.
- Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., Villagra, N.A., Morgado, J., and Mora, G.C. (2010). Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant Salmonella Typhi Expressing S. Typhimurium SPI-3 Sequences. *PLoS ONE* 5, e9394.
- Ritter, D.B., and Gerloff, R.K. (1966). Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus Pasteurella. *J. Bacteriol.* 92, 1838–1839.
- Robb, C.S., Nano, F.E., and Boraston, A.B. (2012). The structure of the conserved type six secretion protein TssL (DotU) from Francisella novicida. *J. Mol. Biol.* 419, 277–283.
- Robertson, G.T., and Roop, R.M.J. (1999). The Brucella abortus host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* 34, 690–700.
- Rocco, C.J., and Escalante-Semerena, J.C. (2010). In Salmonella enterica, 2-Methylcitrate Blocks Gluconeogenesis. *J. Bacteriol.* 192, 771–778.

- Rogutskii, S.V., Khramtsov, M.M., Avchinikov, A.V., Gar'kavaia, O.I., Larchenkova, N.V., Golovanov, A.M., Parfenova, T.A., and Rudkovskaia, L.B. (1997). [An epidemiological investigation of a tularemia outbreak in Smolensk Province]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 33–37.
- Rohlfing, A.E., and Dove, S.L. (2014). Coordinate control of virulence gene expression in *Francisella tularensis* involves direct interaction between key regulators. J. Bacteriol.
- Rohmer, L., Fong, C., Abmayr, S., Wasnick, M., Larson Freeman, T., Radey, M., Guina, T., Svensson, K., Hayden, H.S., Jacobs, M., et al. (2007a). Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. Genome Biol. 8, R102.
- Rohmer, L., Fong, C., Abmayr, S., Wasnick, M., Larson Freeman, T.J., Radey, M., Guina, T., Svensson, K., Hayden, H.S., Jacobs, M., et al. (2007b). Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. Genome Biol 8, R102.
- Rohmer, L., Hocquet, D., and Miller, S.I. (2011). Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. Trends Microbiol. 19, 341–348.
- Romling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H., and Tummler, B. (1994). Epidemiology Of Chronic Pseudomonas aeruginosa Infections In Cystic Fibrosis. J. Infect. Dis. 170, 1616–1621.
- Rosenberger, C.M., and Finlay, B.B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 385–396.
- Rotz, L.D., Khan, A.S., Lillibridge, S.R., Ostroff, S.M., Hughes, J.M., Rotz, L.D., Khan, A.S., Lillibridge, S.R., Ostroff, S.M., and Hughes, J.M. (2002). Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg. Infect. Dis. 8, 225.
- Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012). Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. Curr. Biol. 22, R29–R34.
- Sandstrom, G., Lofgren, S., and Tarnvik, A. (1988). A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 56, 1194–1202.
- Sandstrom, G., Sjostedt, A., Johansson, T., Kuoppa, K., and Williams, J.C. (1992). Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. FEMS Microbiol Immunol 5, 201–210.
- Sandström, G. (1994). The tularaemia vaccine. J. Chem. Technol. Biotechnol. Oxf. Oxf. 1986 59, 315–320.

- Sandström, G., Löfgren, S., and Tärnvik, A. (1988). A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 56, 1194–1202.
- Sansonetti, P. (2000). Bactéries et apoptose. *Ann. Inst. Pasteur Actual.* 11, 65–78.
- Santic, M., Molmeret, M., and Abu Kwaik, Y. (2005a). Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma. *Cell Microbiol* 7, 957–967.
- Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., Jones, S., and Kwaik, Y.A. (2005b). The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol* 7, 969–979.
- Santic, M., Molmeret, M., Barker, J.R., Klose, K.E., Dekanic, A., Doric, M., and Abu Kwaik, Y. (2007). A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cell Microbiol* 9, 2391–2403.
- Santic, M., Asare, R., Skrobonja, I., Jones, S., and Abu Kwaik, Y. (2008). Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun* 76, 2671–2677.
- Sauer, J.-D., Bachman, M.A., and Swanson, M.S. (2005). The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9924–9929.
- Schaible, U.E., and Kaufmann, S.H.E. (2004). Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 946–953.
- Schmerk, C.L., Duplantis, B.N., Wang, D., Burke, R.D., Chou, A.Y., Elkins, K.L., Ludu, J.S., and Nano, F.E. (2009). Characterization of the pathogenicity island protein PdpA and its role in the virulence of *Francisella novicida*. *Microbiology* 155, 1489–1497.
- Schmidt, H., and Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Schulert, G.S., and Allen, L.A. (2006). Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J Leukoc Biol* 80, 563–571.
- Schulert, G.S., McCaffrey, R.L., Buchan, B.W., Lindemann, S.R., Hollenback C, Jones, B.D., and Allen, L.A. (2009). *Francisella tularensis* genes required for inhibition of the



- neutrophil respiratory burst and intramacrophage growth identified by random transposon mutagenesis of strain LVS. *Infect Immun* 77, 1324–1336.
- Schulert GS, McCaffrey RL, Buchan BW, Lindemann SR, Hollenback C, Jones BD, and LA, A. (2009). *Francisella tularensis* Genes Required for Inhibition of the Neutrophil Respiratory Burst and Intramacrophage Growth Identified by Random Transposon Mutagenesis of Strain LVS. *Infect Immun* 77, 1324–1336.
- Schwarz, S., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2010). What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol* 18, 531–537.
- Seibold, E., Bogumil, R., VorderwÄ¼lbecke, S., Al Dahouk, S., Buckendahl, A., Tomaso, H., and Splettstoesser, W. (2007). Optimized application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight MS to differentiate *Francisella tularensis* at the level of subspecies and individual strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49, 364–373.
- Seibold, E., Maier, T., Kostrzewa, M., Zeman, E., and Splettstoesser, W. (2010). Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1061–1069.
- Sen, B., Meeker, A., and Ramakrishnan, G. (2010). The fsIE homolog, FTL\_0439 (fupA/B), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 78, 4276–4285.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91, 31S–38S.
- Singh, S.B. (2006). Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science* 313, 1438–1441.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K., and Vogel, J. (2007). The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 63, 193–217.
- Sjostedt, A. (2006). Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes Infect* 8, 561–567.
- Sjostedt, A. (2007). Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105, 1–29.
- Sjostedt, A. B. (2005). *Francisella* Dorofe'ev 1947, 176 AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (New-York), pp. 200–210.
- Skamene, MD, PhD, E., Schurr, PhD, E., and Gros, PhD, P. (1998). INFECTION GENOMICS: *Nramp1* as a Major Determinant of Natural Resistance to Intracellular Infections. *Annu. Rev. Med.* 49, 275–287.

- Skottman, T., Piiparinen, H., Hyytiäinen, H., Myllys, V., Skurnik, M., and Nikkari, S. (2007). Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 207–211.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., et al. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8487–8492.
- Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012). Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)!: Sensing and Regulation of the Intraphagosomal Environment. *Traffic* 13, 1042–1052.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K.E., and Blasi, U. (2003). Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* 35, 217–228.
- Sorokin, V.M., Pavlovich, N.V., and Prozorova, L.A. (1996). *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13, 249–252.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). Selective Subversion of Autophagy Complexes Facilitates Completion of the *Brucella* Intracellular Cycle. *Cell Host Microbe* 11, 33–45.
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., et al. (2007). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* 5, e244.
- Steele, S., Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., and Kawula, T. (2013). *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathog* 9, e1003562.
- Straskova, A., Cervený, L., Spidlová, P., Danková, V., Belcic, D., Santic, M., and Stulík, J. (2012). Deletion of IglH in virulent *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 strain results in attenuation and provides protection against the challenge with the parental strain. *Microbes Infect* 14, 177–187.
- Su, J., Yang, J., Zhao, D., Kawula, T.H., Banas, J.A., and Zhang, J.R. (2007). Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect Immun* 75, 3089–3101.
- Su, J., Asare, R., Yang, J., Nair, M.K., Mazurkiewicz, J.E., Abu Kwaik, Y., and Zhang, J.R.

- (2011). The capBCA Locus is Required for Intracellular Growth of *Francisella tularensis* LVS. *Front Microbiol* 2, 83.
- Suraweera, A., Münch, C., Hanssum, A., and Bertolotti, A. (2012). Failure of Amino Acid Homeostasis Causes Cell Death following Proteasome Inhibition. *Mol. Cell* 48, 242–253.
- Svensson, K., Larsson, P., Johansson, D., Bystrom, M., Forsman, M., and Johansson, A. (2005). Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 187, 3903–3908.
- Syrjälä, H., Kujala, P., Myllylä, V., and Salminen, A. (1985). Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand. J. Infect. Dis.* 17, 371–375.
- Tamilselvam, B., and Daefler, S. (2008). Francisella targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol* 180, 8262–8271.
- Telepnev, M., Golovliov, I., Grundstrom, T., Tarnvik, A., and Sjostedt, A. (2003). *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol* 5, 41–51.
- Telepnev, M., Golovliov, I., and Sjostedt, A. (2005). *Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Pathog* 38, 239–247.
- Tempel, R., Lai, X.H., Crosa, L., Kozlowicz, B., and Heffron, F. (2006). Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun* 74, 5095–5105.
- Thirumalapura, N.R., Goad, D.W., Mort, A., Morton, R.J., Clarke, J., and Malayer, J. (2005). Structural analysis of the O-antigen of *Francisella tularensis* subspecies tularensis strain OSU 10. *J Med Microbiol* 54, 693–695.
- Thomas, R., Johansson, A., Neeson, B., Isherwood, K., Sjöstedt, A., Ellis, J., and Titball, R.W. (2003). Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 41, 50–57.
- Thomas, R.M., Titball, R.W., Oyston, P.C., Griffin, K., Waters, E., Hitchen, P.G., Michell, S.L., Grice, I.D., Wilson, J.C., and Prior, J.L. (2007). The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies tularensis and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun* 75, 371–378.
- Thomas-Charles, C.A., Zheng, H., Palmer, L.E., Mena, P., Thanassi, D.G., and Furie, M.B. (2013). FeoB-Mediated Uptake of Iron by *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 81, 2828–2837.
- Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C.,

- Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., et al. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18, 1624–1637.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.
- TIGERTT, W.D. (1962). Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines. A review of selected articles. *Bacteriol. Rev.* 26, 354–373.
- Tikhenko, N.I., Efremenko, V.I., Omarieva, E.I., Levchenko, B.I., Aliev, S.G., Chernyshov, S.N., Isaev, A.N., Asvarov, B.M., Batsin, V.T., Davydov, M.S., et al. (2001). [Outbreak of tularemia in the Republic of Dagestan]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 68–72.
- Titball, R.W., and Petrosino, J.F. (2007). *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann N Acad Sci* 1105, 98–121.
- Titball, R.W., Johansson, A., and Forsman, M. (2003). Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiol.* 11, 118–123.
- Tomioka, K., Peredelchuk, M., Zhu, X., Arena, R., Volokhov, D., Selvapandian, A., Stabler, K., Mellquist-Riemenschneider, J., Chizhikov, V., Kaplan, G., et al. (2005). A Multiplex Polymerase Chain Reaction Microarray Assay to Detect Bioterror Pathogens in Blood. *J. Mol. Diagn.* 7, 486–494.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., et al. (2009). Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.
- Traub, A., Mager, J., and Grossowicz, N. (1955). Studies on the nutrition of *Pasteurella tularensis*. *J. Bacteriol.* 70, 60.
- Trevisanato, S.I. (2007). The “Hittite plague”, an epidemic of tularemia and the first record of biological warfare. *Med. Hypotheses* 69, 1371–1374.
- Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M., and Thibault, P. (2009). The Phagosomal Proteome in Interferon- $\gamma$ -Activated Macrophages. *Immunity* 30, 143–154.
- Tsuchiya, K., Hara, H., Kawamura, I., Nomura, T., Yamamoto, T., Daim, S., Dewamitta, S.R., Shen, Y., Fang, R., and Mitsuyama, M. (2010). Involvement of Absent in

- Melanoma 2 in Inflammasome Activation in Macrophages Infected with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 185, 1186–1195.
- Twine, S., Bystrom, M., Chen, W., Forsman, M., Golovliov, I., Johansson, A., Kelly, J., Lindgren, H., Svensson, K., Zingmark, C., et al. (2005). A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun* 73, 8345–8352.
- Twine, S.M., Mykytczuk, N.C., Petit, M.D., Shen, H., Sjostedt, A., Wayne Conlan, J., and Kelly, J.F. (2006). In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1621–1633.
- Vaissaire, J., Mendy, C., Le Doujet, C., and Le Coustumier, A. (2005). La tularémie. La maladie et son épidémiologie en France. *Médecine Mal. Infect.* 35, 273–280.
- Vaissaire J (2001). La tularémie : une zoonose à surveiller. *Bull. GTV* 235–238.
- Vaissaire J, Le Coustumier A, Arlet G, and Fenollar F (2007). Des agents très spéciaux en bactériologie.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 51, 1525–1533.
- Vinogradov, E., and Perry, M.B. (2004). Characterisation of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr Res* 339, 1643–1648.
- Waag, D.M., McKee, K.T., Sandstrom, G., Pratt, L.L., Bolt, C.R., England, M.J., Nelson, G.O., and Williams, J.C. (1995). Cell-mediated and humoral immune responses after vaccination of human volunteers with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 143–148.
- Waag, D.M., Sandström, G., England, M.J., and Williams, J.C. (1996). Immunogenicity of a new lot of *Francisella tularensis* live vaccine strain in human volunteers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13, 205–209.
- Wehrly, T.D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Child, R., Edwards, J.A., Brouwer, D., Nair, V., Fischer, E.R., Wicke, L., et al. (2009). Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell. Microbiol.* 11, 1128–1150.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 155–187.
- Weiss, G. (2002). Phagocytes, Immunology and Inflammation. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 70–78.

- Weiss, D.S., Henry, T., and Monack, D.M. (2007). *Francisella tularensis*: activation of the inflammasome. *Ann N Acad Sci* 1105, 219–237.
- Williams, P., and Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 182–191.
- Williams, M.D., Ouyang, T.X., and Flickinger, M.C. (1994). Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol Microbiol* 11, 1029–1043.
- Winter, S.E., Thiennimitr, P., Winter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsolis, R.M., et al. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467, 426–429.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., and Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489–492.
- Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J.J. (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* 69, 691–697.
- Yilmaz, A., Sater, A.A., Yao, L., Koutouzis, T., Pettengill, M., and Ojcius, D.M. (2010). ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell. Microbiol.* 12, 188–198.
- Young, V.R. (1994). Adult amino acid requirements: the case for a major revision in current recommendations. *J Nutr* 124, 1517S–1523S.
- Zaki, M.H., Akuta, T., and Akaike, T. (2005). Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* 98, 117–129.
- Zarrella, T.M., Singh, A., Bitsakis, C., Rahman, T., Sahay, B., Feustel, P.J., Gosselin, E.J., Sellati, T.J., and Hazlett, K.R. (2011). Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS One* 6, e22335.
- Zhong, W., Lafuse, W.P., and Zwilling, B.S. (2001). Infection with *Mycobacterium avium* Differentially Regulates the Expression of Iron Transport Protein mRNA in Murine Peritoneal Macrophages. *Infect. Immun.* 69, 6618–6624.
- Zwilling, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff, L., Brown, D., and Lafuse, W. (1999). Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.* 67, 1386–1392.

(1997). Tularémie.

## Résumé :

*Francisella tularensis*, agent étiologique de la tularémie, est un pathogène intracellulaire facultatif capable d'infecter de nombreuses cellules de mammifères. Pour se multiplier activement dans le cytoplasme des cellules hôtes, la bactérie doit être en mesure de capter dans cet environnement tous les composés nécessaires à son métabolisme, et notamment des acides aminés qui représentent ses principales sources de carbone et d'azote. Les pathogènes à multiplication intracellulaire ont mis en place un ensemble de mécanismes, visant i) la manipulation des voies métaboliques de l'hôte, pour accroître le pool de nutriments disponibles, et ii) l'expression de transporteurs dédiés, pour la captation optimale de ces nutriments. Cet ensemble de mécanismes est regroupé sous le terme de « virulence nutritionnelle ». Chez *Legionella pneumophila*, plusieurs membres d'une sous-famille de transporteurs actifs secondaires (désignés Pht, ou transporteurs phagosomaux), responsables de la captation des acides aminés lors de la phase intracellulaire de la bactérie, ont été caractérisés.

Dans ce travail, nous avons établi le rôle de deux membres de la sous-famille des transporteurs Pht (désignés AnsP et IleP), dans le transport d'acides aminés et la virulence de *Francisella*. La protéine AnsP est un transporteur d'asparagine. La délétion du gène codant pour ce transporteur n'a pas d'effet sur la croissance de *Francisella* en milieu synthétique, mais entraîne une diminution drastique de sa multiplication intracellulaire dans tous les types cellulaires testés, ainsi qu'une atténuation importante de la virulence chez la souris. La perte de virulence du mutant *asnP* est réversible aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* par ajout d'asparagine en excès. *F. tularensis*, qui est prototrophe pour l'asparagine en milieu minimum, devient donc auxotrophe dans le cadre de sa croissance intracellulaire, et nécessite un transport de cet acide aminé via AnsP. Ce changement de besoins en asparagine entre le milieu extérieur et le milieu intracellulaire illustre bien le phénomène d'adaptation nutritionnel que réalise la bactérie dans le cadre d'une infection.

La délétion du second transporteur, IleP, entraîne un défaut de croissance en milieu minimum, réversible par ajout de thréonine, un précurseur métabolique de l'isoleucine chez *F. tularensis* subsp. *novicida*. Des expériences d'incorporation d'isoleucine marquée ont permis de mettre en évidence la fonction de transporteur d'isoleucine de la protéine IleP. La délétion du gène codant pour IleP entraîne également un défaut de multiplication *in vitro*, associé à un léger retard de sortie du phagosome ainsi qu'une atténuation importante de la virulence chez la souris. Ce transporteur assure donc la captation de l'isoleucine dans des conditions où l'utilisation de la thréonine, ne permet pas d'assouvir les besoins de la bactérie. De façon remarquable, la voie de biosynthèse de l'isoleucine *via* la thréonine est interrompue chez les sous-espèces *tularensis* et *holarctica*. La croissance de ces sous espèces, plus virulentes que *novicida*, dans la cellule infectée devient donc strictement dépendante du transport de l'isoleucine par IleP. Cet exemple constitue une parfaite illustration de la spécialisation des souches pathogènes aux conditions nutritionnelles de leur hôte.

En conclusion, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a permis de démontrer la participation de deux transporteurs d'acides aminés à la virulence nutritionnelle de la bactérie *Francisella*.